



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Snježana Čipčić

**POVEZANOST MORFOMETRIJSKIH
SVOJSTAVA SPERMIJA S
POKAZATELJIMA KAKVOĆE
ODMRZNUTOGA SJEMENA
JARČEVA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

VETERINARY FACULTY

Snježana Čipčić

**ASSOCIATION OF MORPHOMETRIC
CHARACTERISTICS OF BUCK
SPERMATOTZOA WITH QUALITY
PARAMETERS OF
THAWED/FROZEN SEMEN**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

SNJEŽANA ČIPČIĆ

**POVEZANOST MORFOMETRIJSKIH
SVOJSTAVA SPERMIJA S
POKAZATELJIMA KAKVOĆE
ODMRZNUTOGA SJEMENA
JARČEVA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

izv. prof. dr. sc. Ivona Žura Žaja
prof. dr. sc. Silvijo Vince

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

VETERINARY FACULTY

Snježana Čipčić

**ASSOCIATION OF MORPHOMETRIC
CHARACTERISTICS OF BUCK
SPERMATOTZOA WITH QUALITY
PARAMETERS OF
THAWED/FROZEN SEMEN**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Assoc. Prof. Ivona Žura Žaja, PhD

Full Prof. Silvijo Vince, PhD

Zagreb, 2025



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

I Z J A V A

Ja, Snježana Čipčić, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mogega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima osim navedenih u radu.

(potpis studenta)

Zagreb, 2025.

INFORMACIJAMA O MENTORIMA

Ivona Žura Žaja rođena je u Kopru, a osnovno i srednjoškolsko obrazovanje završila je u Poreču. Diplomirala je 2007. godine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Nakon pripravničkog staža u Veterinarskoj stanici u Sesvetama, zaposlila se na Zavodu za fiziologiju i radiobiologiju na Veterinarskom fakultetu kao znanstvena novakinja. Daljnje usavršavanje nastavila je kroz poslijediplomski doktorski studij Veterinarskih znanosti na istom fakultetu, koji je završila 2015. godine s doktorskim radom pod naslovom "Pokazatelji antioksidacijskoga sustava u sjemenoj plazmi i spermijima rasplodnih nerasta različitih pasmina". 2018. godine izabrana je u znanstveno-nastavno zvanje docentice, a u 2023. godini izabrana je u znanstveno-nastavno zvanje izvanredne profesorice. Sudjelovala je u brojnim istraživačkim projektima, među kojima se ističu znanstveni projekt o ulozi antioksidansa u očuvanju zdravlja životinja i bilateralni projekt o biokemijskim pokazateljima u liječenju nozemoze kod pčela. Također je bila suradnica na inovativnom projektu razvoja funkcionalnih proizvoda od janjećeg mesa, financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost. Ivona Žura Žaja dobitnica je niza nagrada na međunarodnim sajmovima inovacija Agro Arca, uključujući srebrne medalje 2019. i 2021. godine te brončanu medalju 2022. godine. Aktivna je članica stručnih i znanstvenih udruženja, kao što su Hrvatska veterinarska komora i Hrvatsko društvo fiziologa, te međunarodnih organizacija poput International Association of Education in Animal Science (ISEAS). Na međunarodnim znanstvenim skupovima sudjelovala je kao predavačica i autorica pozvanih predavanja, gdje je predstavljala radove o reprodukciji domaćih životinja, procjeni kvalitete sperme te primjeni morfometrijskih metoda u veterinarskoj medicini. Akademsku mobilnost ostvarila je u akademskoj godini 2023./2024. kao gostujuća profesorica na Fakultetu veterinarske medicine Poljoprivrednog sveučilišta u Tirani. Osim znanstvenog i nastavnog rada, bila je aktivna u organizaciji međunarodnih znanstvenih skupova i kongresa, gdje je obnašala dužnosti članice i potpredsjednice organizacijskih odbora. Ivona Žura Žaja autorica je brojnih znanstvenih radova koji obuhvaćaju teme poput antioksidativnog statusa, utjecaja radiofrekvencijskog zračenja na plodnost i primjene novih metoda u veterinarskoj medicini. Njezini radovi objavljeni su u priznatim znanstvenim časopisima te su prepoznati u međunarodnoj znanstvenoj zajednici. Najbolja publikacija u karijeri: VINCE, S., I. ŽURA ŽAJA, M. SAMARDŽIJA, I. MAJIĆ BALIĆ, M. VILIĆ, D. ĐURIČIĆ, H. VALPOTIĆ, F. MARKOVIĆ, S. MILINKOVIĆ-TUR (2017): Age related differences of semen quality, seminal plasma, and spermatozoa antioxidative and oxidative stress variables in bulls during cold and warm periods of the year. *Animal*, 3, 559-568.

Silvijo Vince rođen je 25.10.1976 godine u Zagrebu. Osnovnu školu završio je u Osnovnoj školi «Vjenceslav Novak» u Zagrebu. Srednju Veterinarsku školu završio je 1995 godine. Iste godine upisuje Veterinarski fakultet u Zagrebu. Diplomirao je 25.2.2003 godine. Poslije toga radi kao pripravnik u privatnoj Veterinarskoj ambulanti «Noa» u Zagrebu. Od 01. siječnja 2004 godine radi na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu na Klinici za porodništvo i reprodukciju kao asistent-znanstveni novak na projektu profesora Antuna Tomaškovića „Značaj trofoblast proteina u preživljavanju embrija papkara“. Školske godine 2003/04 upisuje znanstveni poslijediplomski studij „Teriogenologija domaćih životinja“. Akademski stupanj doktor znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, znanstveno polje veterinarska medicina, znanstvena grana klinička veterinarska medicina, stekao je 04. prosinca 2009. Godine obranom doktorske disertacije pod naslovom „Primjena modificiranoga protokola za izazivanje superovulacije u koza burske pasmine“. Viši asistent postaje 2010. godine, a znanstveni suradnik iste godine. Viši znanstveni suradnik postaje 2011. godine. Nakon habilitacijskog predavanja pod naslovom “Fiziologija reprodukcije malih preživača”, izabire se u znanstveno-nastavno zvanje docenta 2012. Godine te iste godine postaje znanstveni savjetnik. U nastavno zvanje izvanredni profesor izabire se 2017. godine. Dvije godine kasnije postaje znanstveni savjetnik u trajnom zvanju, a redovni profesor postaje 2022. godine. Sudjeluje u izvođenju nastave obaveznih predmeta intergriranog prediplomskog i diplomskog studija: Porodništvo i reprodukcija domaćih životinja I i II, Ambulantna klinika, Zdravlje stada te u izvođenju kolegija Bolesti i liječenje farmskih životinja, Bolesti i liječenje konja te Bolesti i liječenje pasa i mačaka. Od 2018. godine postaje nositelj predmeta Asistirana reprodukcija u veterinarskoj medicini, a od 2023. nositelj predmeta Porodništvo i reprodukcija domaćih životinja I. Zamjenik je predstojnika zavoda “Ambulantna klinika”. Objavio je više od 150 znanstvenih i stručnih radova, od kojih je 62 objavljeno u časopisima indeksiranim u WoSCC (Web of Science Core Collection), Scopus ili Medline. Prema Scopus-u ima više od 900 citata i h-indeks 17. Najveći dio radova vezan je za preživače. Autor je i udžbenika pod naslovom “Rasplodivanje ovaca i koza“. Održao je više desetaka izlaganja na domaćim i međunarodnim znanstvenim i stručnim skupovima. Do sada je aktivno sudjelovao u realizaciji 12 domaćih i međunarodnih znanstvenih projekata

Ovim putem želim izraziti svoju duboku zahvalnost svojim mentorima, prof. dr. sc. Silviju Vinceu i izv. prof. dr. sc. Ivoni Žura Žaja, na nesebičnoj podršci, stručnom vodstvu i neiscrpnom strpljenju tijekom cijelog trajanja doktorskog studija i izrade ovog doktorskog rada. Vaše savjete, motivaciju i povjerenje smatram neprocjenjivim dijelom svog akademskog razvoja.

Posebno cijenim vaše vrijeme, konstruktivne kritike i znanje koje ste nesebično dijelili, pomažući mi da istražujem, učim i rastem kao istraživač. Vaša posvećenost i mentorstvo nisu samo obogatili ovaj rad, već su i ostavili dubok trag na mom profesionalnom putu.

Također želim zahvaliti svim kolegama, profesorima i suradnicima koji su mi na bilo koji način pomogli i podržali me u ovom procesu. Bez vas, ovaj rad ne bi bio moguć.

SAŽETAK

Povezanost morfometrijskih svojstava spermija s pokazateljima kakvoće odmrznutoga sjemena jarčeva

Procjena plodnosti mužjaka ključna je za genetski napredak u uzgoju, a temeljna se procjena temelji na analizi kakvoće sjemena. Morfometrijska obilježja spermija, poput veličine i oblika glave, duljine središnjeg dijela i repa, povezana su s njihovim funkcionalnim svojstvima i potencijalom oplodnje. Unatoč napretku u analitičkim tehnikama, podaci o povezanosti morfometrijskih karakteristika smrznutih/odmrznutih spermija jarčeva i kakvoće sjemena su oskudni. Cilj ovog istraživanja je utvrditi odnos između morfometrijskih svojstava spermija jarčeva i kinetičkih pokazatelja kakvoće odmrznutog sjemena. U istraživanje je bilo uključeno 12 klinički zdravih jarčeva pasmine francuska alpina, starosti od 1,5 do 4 godine, koje je provedeno izvan rasplodne sezone, a ejakulati su prikupljeni tjedno. Nakon standardne procjene ejakulata, izdvojena je sjemena plazma te su spermiji pomiješani sa sintetskim razrjeđivačem, ohlađeni i zamrznuti u tekućem dušiku. Nakon odmrzavanja 30 pajeta, pomoću kompjuterske analize spermija, određeni su pokazatelji gibljivost i brzine spermija (ukupna i progresivna gibljivost, manježno kretanje, krivolinijska brzina (VCL), pravolinijska brzina (VSL), prosječna brzina (VAP), amplituda lateralnog otklona glave u odnosu na prosječnu putanju (ALH), indeks linearnosti (LIN), indeks oscilacije (WOB), pravolinijske indeks (STR), frekvencija prelaska pravolinijske putanje u sekundi (BCF). Od 30 pajeta napravljeno je 30 obojenih razmaza, na kojima su morfometrijskom analizom glava i repova spermija određeni pokazatelji veličine (površina, opseg, duljina i širina) te pokazatelji oblika glave (pravilnost, naboranost, eliptičnost i izduženost) pomoću programa SFORM (100 spermija po razmazu). Nakon multivarijatne regresijske i MANOVA analize najviše uključenih morfometrijskih pokazatelja koji su imali utjecaj na kinetičke pokazatelje spermija imali su duljina glave (13 puta), zatim opseg spojnog dijela (8 puta) te duljina repa spermija (7 puta). Prethodnim analizama ustanovljeno je da spermiji veće eliptičnosti i duljine glave (dulje glave, manje širine) imaju bolju STR i LIN gibljivost, ali i manju VCL i VAP brzinu spermija. Isto tako spermiji veće površine spojnog dijela spermija imali su veće VAP brzine, a spermiji veće duljine repa imali su značajno veće VCL, VSL i VAP brzine. Klaster analizom dobivene su 3 subpopulacije spermija (S1 - spermiji s najmanjom eliptičnošću, elongacijom i pravilnošću glave, najkraćim repom i najvećom širinom spojnog dijela; S2 - najveći spermiji s najvećom glavom, spojnim dijelom i najduljim repom te najboljom eliptičnosti, elongacijom

i pravilnosti glave; S3 - najmanji spermiji), a odnos tih subpopulacija na kinetičke pokazatelje ide u prilog prethodnim analizama. Tako su najveći spermiji S2 subpopulacije imali značajno bolju progresivnu gibljivost (LIN i STR), ali manju snagu spermija (ALH i BCF). Fuziformni oblik spermija, s lagano izduljenom glavom i dugim repom, savršen je za ravnomjerno i propulzivno plivanje zbog povoljnog hidrodinamičkog oblika. Duljina glave spermija pokazala se kao najvažniji morfometrijski pokazatelj za kinetičke pokazatelje, pri čemu veća duljina i eliptičnost glave omogućuju pravocrtnije gibanje kroz ženski reproduktivni sustav. Spermiji s manjim glavama imaju veće vrijednosti ALH i BCF zbog manjeg otpora, dok veći spojni dio i dulji rep pozitivno utječu na brzinu i snagu spermija. Optimalan omjer subpopulacija većih progresivno gibljivih spermija i manjih agilnih spermija u ejakulatu osigurava učinkovito savladavanje prepreka do oplodnje.

Ključne riječi: morfometrijska svojstva, spermiji, pokazatelji kakvoće, kinetički pokazatelji, smrznuto/odmrznuto sjeme, jarčevi

ASSOCIATION OF MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF BUCK SPERMATOTZOA WITH QUALITY PARAMETERS OF THAWED/FROZEN SEMEN

BACKGROUND AND AIMS: The fertility evaluation of breeding males is critical for achieving genetic progress in livestock production, as inadequate selection can disrupt long-term breeding programs. Fertility assessment relies on the evaluation of semen quality, which is essential for calculating doses for artificial insemination. Traditional subjective methods are increasingly being replaced by automated systems to enhance accuracy and precision. These advanced systems address the limitations of standard techniques that often fail to detect subtle differences among spermatozoa, enabling the identification of spermatozoa subpopulations with distinct morphometric characteristics. Spermatozoa morphometry measures dimensions such as head area, midpiece size, and tail length. An increased midpiece enhances energy production due to a higher mitochondrial content, while a longer tail improves motility and ensures timely arrival at the site of fertilization. Both components are crucial for effective spermatozoa function. Morphometric analysis has revealed correlations between spermatozoa characteristics, such as head and tail dimensions, and their functional capabilities, including motility and fertilization potential. Despite advancements in analytical techniques, studies on buck spermatozoa morphometry and its relationship with semen quality remain limited. Morphometric traits like head size and shape, midpiece dimensions, and tail length are closely linked to the sperm's ability to successfully navigate the female reproductive tract and achieve fertilization. Objective evaluation of these traits has become essential for ensuring the quality of semen used in artificial insemination protocols. Progressive motility plays a vital role in enabling spermatozoa to traverse cervical mucus and reach the oviducts, where fertilization occurs. These characteristics, along with spermatozoa kinetic parameters, influence the fertilization potential of spermatozoa, making their analysis crucial. Computer-assisted sperm analysis (CASA) systems improve the accuracy and repeatability of these evaluations. While multivariate analyses have been successfully used to study spermatozoa subpopulations across species, data on buck spermatozoa morphometry and its relationship with semen quality are limited. Variations in the structure of the head, mid-piece, and tail of spermatozoa, as well as the proportion of individual subpopulations within the semen, are associated with reduced male fertility, early embryonic mortality, and the efficiency of semen preservation. Although the morphometric characteristics of spermatozoa have been extensively studied in many domestic animals, data on the relationship between the morphometric traits of frozen/thawed buck spermatozoa and their subpopulations with kinetic semen quality indicators are still unavailable. Therefore, the aim of this study is to investigate the relationship between the

morphometric characteristics of buck spermatozoa and the kinetic quality indicators of thawed semen.

MATERIALS AND METHODS: The experiment involved 12 clinically healthy French Alpine bucks, aged between 1.5 and 4 years, with body weights ranging from 40 to 60 kg. The bucks were housed on three family farms, with four bucks on each farm, within the area of the Veterinary Station d.d. Varaždin, Jalžabet regional clinic. All farms were located within 5 km of each other, and each farm had approximately 60 goats of the same breed, housed separately from the bucks. The study was conducted outside the breeding season, from early March to late May, over a period of 12 weeks. Ejaculates were collected from the bucks using an artificial vagina. During the study, ejaculates were collected weekly from the bucks in the morning hours. For ejaculate collection on each farm, estrus was induced in two does that served as dummies. A total of 30 ejaculates were randomly selected for this study. All ejaculate samples were evaluated using standard ejaculate assessment methods, including volume, sperm concentration in the ejaculate, sperm motility, sperm vitality assessment, and morphological evaluation of sperm in the ejaculate. Following evaluation and separation of seminal plasma, the spermatozoa were mixed with a synthetic diluent. These diluted spermatozoa samples were then subjected to a cooling process, followed by deep freezing in goblets with liquid nitrogen (-196 °C). After thawing, a portion of the ejaculate from the straw was used for cytological and morphological analysis. In samples of frozen/thawed semen, various indicators of spermatozoa velocity and motility, as well as morphometric analysis of spermatozoa, were determined. In the samples of semen, the indicators of motility (spermatozoa motility, progressive motility) and spermatozoa velocity indicators were determined (curvilinear velocity - VCL, straight-line velocity - VSL, average path velocity - VAP, amplitude of lateral head displacement - ALH, linearity - LIN, wobble - WOB, straightness - STR, beat cross frequency - BCF) using computer assisted sperm analyzer. Semen smears were prepared from diluted semen samples of bucks and stained according to Spermac method. The stained sperm smears were then subjected to computer analysis on a personal computer using the SFORM program (VAMSTEC, Zagreb, Croatia) (basic morphometric features/characteristics of spermatozoa, 100 spermatozoa per smear). The following morphometric indicators of spermatozoa head and tail size such as: area, outline, length, width, and parameters for head shape: regularity, rugosity, ellipticity, elongation were determined. Statistical data analysis was performed by the SAS 9.4 software package (Statistical Analysis Software 2002-2012 from SAS Institute Inc., Cary, USA).

RESULTS: Morphometric measurements of the spermatozoa head, mid-piece, and tail revealed that the head length constitutes approximately 15% of the total spermatozoa length, the main portion of the tail (tail without the mid-piece) constitutes about 62% of the total spermatozoa length in bucks, and the mid-piece accounts for about 22% of the total spermatozoa length. The highest coefficients of variation in spermatozoa head measurements were recorded for head ellipticity and elongation (9.75%, 13.79%), while variations in the mid-piece were observed in width and minimum radius (22.0%, 37.7%). Multivariate regression and multivariate variance analyses revealed that the most impactful morphometric parameters influencing spermatozoa kinetic parameters included head length (13 times), head circumference and rugosity (8 times each), mid-piece circumference (8 times), and spermatozoa tail length (7 times). Regression analysis identified only a few statistically significant correlations, such as a positive relationship between head ellipticity and spermatozoa STR motility and a negative relationship between the mid-piece width and VSL, VAP, and LIN motility. Multivariate analysis of variance showed that spermatozoa with greater head ellipticity and length (longer, narrower heads) exhibited better STR and LIN motility but significantly lower VCL and VAP velocities. Similarly, spermatozoa with a larger mid-piece surface area demonstrated higher VAP velocities and significantly greater spermatozoa vigor parameters (ALH and BCF), crucial for egg penetration. Spermatozoa with longer tails achieved significantly higher VCL, VSL, and VAP velocities but had a significantly lower average number of spermatozoa beat cross frequency (BCF). Additionally, spermatozoa with more regular heads exhibited significantly higher amplitude of lateral head displacement compared to their average path, while spermatozoa with greater head rugosity were significantly more progressively motile (STR and LIN). Principal component analysis of spermatozoa morphometric parameters identified five principal components (factors) with eigenvalues (λ) ≥ 1 , explaining a total of 86.7% of the variance. Factor 1 (spermatozoa head elongation) had the highest eigenvalue ($\lambda=4.01$) and explained the largest proportion of variance (30.9%). This factor focused on head elongation measures (length, elongation, and ellipticity) and was negatively correlated with head rugosity. The highest values within Factor 1 were for elongation and ellipticity (0.95 and 0.94). Factor 2, explaining 21.8% of the variance with an eigenvalue of 2.83, focused on spermatozoa head size (width, surface area, and circumference), with surface area showing the highest value (0.84). Factor 3, explaining 17% of the variance with an eigenvalue of 2.21, focused on the size of the mid-piece, encompassing length, area, and outline, with outline and length showing the highest values (0.79 and 0.75).

Factor 4, with an eigenvalue of 1.16 and explaining 9% of the variance, focused on tail length (0.63) and was negatively correlated with the width of the mid-piece (-0.74). The fifth and final factor, focused solely on head regularity (0.86), had an eigenvalue of 1.03 and accounted for 7.9% of the variance. Cluster analysis identified three well-defined spermatozoa subpopulations (S1, S2, and S3). The first subpopulation (S1) represented only 11.9% of the total population and included spermatozoa with the smallest head ellipticity, elongation, and regularity, along with the shortest tail but the widest mid-piece. The second subpopulation (S2) accounted for 44.8% of the total population and included the largest spermatozoa with the highest head ellipticity, elongation, and regularity. The mid-piece in this subpopulation exhibited the greatest length, surface area, and circumference, with the longest tail. The third subpopulation (S3) accounted for 43.3% of the population and consisted of the smallest spermatozoa with slightly shorter tails than those in S2. Relationships between these subpopulations and spermatozoa kinetic parameters aligned with previous analyses. Spermatozoa with higher average straight-line velocities ($VSL \geq 50$) showed a statistically significant lower proportion of S1 and a higher proportion of S2 compared to spermatozoa with lower average straight-line velocities ($VSL < 50$). Spermatozoa with higher curvilinear velocities ($VCL \geq 93$) and linearity ($LIN \geq 60\%$) exhibited a significantly lower proportion of S1 and S3 and a higher proportion of S2 compared to less progressive spermatozoa ($VCL \geq 93$, $LIN < 60\%$). Spermatozoa with better straightness (STR) based on the formula ($VAP-VSL < 1/3 VSL$) had significantly lower proportions of S1 and S3 and a higher proportion of S2 compared to sperm with poorer straightness ($VAP-VSL \geq 1/3 VSL$). Lastly, spermatozoa with greater amplitude of lateral head displacement ($ALH \geq 3.1$) and a higher average number beat cross frequency ($BCF \geq 9.7$) had significantly lower proportions of S2 and higher proportions of S3 compared to spermatozoa with lower amplitude of lateral head displacement ($ALH < 3.1$) and beat cross frequency ($BCF < 9.7$).

CONCLUSIONS: The findings suggest that spermatozoa with an elongated head and long tail have an optimal hydrodynamic shape for smooth and propulsive swimming, similar to aquatic organisms. The head length stands out as the most influential morphometric factor affecting spermatozoa motility. A larger and more elliptical head shape supports progressive and straighter movement, essential for navigating the female reproductive tract. Smaller spermatozoa show higher ALH and BCF due to reduced hydrodynamic resistance. A wider mid-piece in spermatozoa contributes to increased speed and strength; however, the shape of the head is the most critical factor, playing the dominant role in determining sperm

performance. Longer tails enhance all velocity parameters, while shorter tails compensate with a wider mid-piece. An ideal balance between large, progressive spermatozoa and smaller, agile sperm likely ensures successful navigation through the cervix, uterus, and oviduct, optimizing fertilization potential. In conclusion, the obtained results indicate that spermatozoa morphometric properties, such as head and tail length and the shape of the mid-piece, significantly influence kinetic parameters and progressive spermatozoa motility, which are crucial for fertilization. The proportion of different spermatozoa subpopulations, including the largest and most progressive spermatozoa and the smallest spermatozoa with enhanced oocyte penetration capability, could represent an optimal composition for successfully overcoming barriers in the female reproductive system. Further research is needed to confirm and apply these observations.

KEYWORDS: morphometric characteristics, spermatozoa, quality parameters, kinetic parameters, thawed/frozen semen, bucks

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	3
2.1. REPRODUKCIJA JARCA	3
2.1.1. Funkcijska anatomija spolnog sustava jarca	3
2.1.2. Primjenjena fiziologija spolnog sustava jarca	9
2.1.3. Pubertet jarca	13
2.1.4. Sezonalnost i sezona parenja	14
2.1.5. Briga i upravljanje jarcem	15
2.1.6. Procjena spolne sposobnosti jarca	16
2.2. PROCJENA EJAKULATA	17
2.3. MORFOLOŠKE I FUNKCIONALNE OSOBITOSTI REPA SPERMIJA IZMEĐU RAZLIČITIH VRSTA SISAVACA	21
2.3. NAVIGACIJA SPERMIJA: BIOMEHANIČKI I HIDRODINAMIČKI IZAZOVI OPLODNJE	23
2.3.1. Mehanizmi navigacije spermija i izazovi na putu do oplodnje	23
2.3.2. Hidrodinamika i obrasci gibanja spermija	24
2.4. MORFOMETRIJSKA ANALIZA I POVEZANOST MORFOLOGIJE SPERMIJA S PLODNOŠĆU RASPLODNJAKA	25
3. OBRAZLOŽENJE TEME	28
4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA	31
4.1. ŽIVOTINJE, SMJEŠTAJ I HRANIDBA	31
4.2. DIZAJN POKUSA I POSTUPCI SA ŽIVOTINJAMA	32
4.3. POLUČIVANJE I POSTUPAK SA EJAKULATOM	33
4.3.1. <i>POLUČIVANJE EJAKULATA</i>	33
4.3.2. <i>OPREMA ZA POLUČIVANJE I POSTUPAK SA EJAKULATOM</i>	35
4.4. OCJENA EJAKULATA	38
4.4.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE EJAKULATA	38
4.4.2. ODREĐIVANJE GIBLJIVOSTI SPERMIJA	38
4.4.3. OCJENA VITALNOSTI SPERMIJA U EJAKULATU	38
4.4.4. MORFOLOŠKA OCJENA SPERMIJA U EJAKULATU	39
4.5. SMRZAVANJE EJAKULATA	39
4.5.1. OCJENA EJAKULATA NAKON OTAPANJA	40
4.6. MORFOMETRIJSKA ANALIZA SPERMIJA	43
4.7. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	45
5. REZULTATI	47

5.1. DESKRIPTIVNI PODATCI RAZLIČITIH POKAZATELJA BRZINE I GIBANJA SPERMIJA.....	47
5.2. DESKRIPTIVNI PODATCI RAZLIČITIH MORFOMETRIJSKIH POKAZATELJA SPERMIJA.....	49
5.3. SUBPOPULACIJE SPERMIJA NA OSNOVU MORFOMETRIJSKIH PARAMETARA GLAVE, SPOJNOG DIJELA I REPA SPERMIJA.....	51
5.4. ODABIR VARIJABLI PRILIKOM MULTIVARIJANTNE LINEARNE REGRESIJSKE ANALIZE I MULTIVARIJANTNE ANALIZE VARIJANCE (MANOVA)	55
5.5. MULTIVARIJANTNA LINEARNA REGRESIJSKA ANALIZA MORFOMETRIJSKIH POKAZATELJA SPERMIJA ZA SVAKI KINETIČKI POKAZATELJ	58
5.6. MULTIVARIJANTNA ANALIZA VARIJANCE MORFOMETRIJSKIH POKAZATELJA SPERMIJA ZA SVAKI KINETIČKI POKAZATELJ	63
5.7. ANALIZA UDJELA SUBPOPULACIJA SPERMIJA UNUTAR GRUPIRANIH KINETIČKIH POKAZATELJA SPERMIJA.....	71
5.8. ANALIZA TRODIMENZIONALNE PUTANJE PLIVANJA S MORFOMETRIJSKIM POKAZATELJIMA SPERMIJA.....	79
6. RASPRAVA	81
6.1. KINETIČKI POKAZATELJI SPERMIJA	81
6.2. MORFOMETRIJSKI POKAZATELJI SPERMIJA.....	82
6.3. ODNOS MORFOMETRIJSKIH POKAZATELJA PREMA KINETIČKIM POKAZATELJIMA SPERMIJA.....	85
7. ZAKLJUČCI.....	94
8. POPIS LITERATURE	95
9. ŽIVOTOPIS S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA....	114

1. UVOD

Odgovarajuća procjena plodnosti rasplodnjaka ključna je za genetski napredak u uzgoju, jer loš odabir može narušiti dugoročne planove uzgoja stoke. Procjena plodnosti temelji se na analizi kakvoće sjemena, ključnom za izračunavanje doza za umjetno osjemenjivanje (VALVERDE i sur., 2016., RIBAS-MAYNOU i sur., 2023.). Tradicionalni subjektivni postupci zamjenjuju se automatiziranim uređajima radi smanjenja subjektivnosti i povećanja preciznosti (MAROTO-MORALES i sur., 2016., FINELLI i sur., 2021.). Standardne metode procjene ne mogu prepoznati sitne razlike između spermija, što je dovelo do razvoja računalno potpomognute analize morfologije spermija. Ova metoda omogućuje brzo utvrđivanje subpopulacija spermija s različitim morfometrijskim karakteristikama (PEÑA i sur., 2005., RUBIO-GUILLÉN i sur., 2007., QUINTERO-MORENO i sur., 2007., VALVERDE i sur., 2016., MASIDE i sur., 2023.).

Morfometrija spermija mjeri dimenzije poput površine glave i duljine repa. Povećanje središnjeg dijela povećava energiju spermija zbog više mitohondrija, dok duži rep povećava brzinu (GOMENDIO i ROLDAN, 2008.). FIRMAN i SIMMONS (2010.) navode da je veličina središnjeg dijela prediktor brzine spermija kod miševa, dok MALO i sur. (2006.) bilježe suprotan efekt kod jelena. Povezanost između duljine središnjeg dijela i repa s kompeticijom spermija primijećena je kod ptica (WIBOWOA i sur., 2013.). Funkcija spermija povezana je s morfometrijom, uključujući dimenzije glave i repa (IMMLER i sur., 2010., SHAHANI i sur., 2010.). Kod bikova se morfometrija glave smatra dobrim pokazateljem kakvoće sperme (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2007., SOUSA i sur., 2013.).

Iako su multivarijantne analize uspješno korištene za proučavanje subpopulacija spermija u raznim vrstama (THURSTON i sur., 2001., BUENDÍA i sur., 2002., ESTESO i sur., 2006., RUBIO-GUILLÉN i sur., 2007.), podaci o morfometrijskim pokazateljima spermija jarčeva su oskudni. Površina glave spermija obuhvaća 65 % genetske informacije, a smanjenje površine povezano je sa smanjenom plodnošću (BARTH i sur., 1992.). Abnormalna morfologija spermija povezana je s ranim gubitkom embrija, smanjenom plodnošću i vezanjem na jajnu stanicu (KRUGER i sur., 1993., DE JARNETTE i sur., 1992., KOT i HANDEL, 1987.). Razlike u procjenama često su rezultat subjektivne analize, pa se koriste računalno potpomognute metode za poboljšanje točnosti (SINHA i sur., 2014., FINELLI i sur., 2021.).

Progresivno gibljivi spermiji prolaze cervikalnu sluz i dosežu jajovode gdje dolazi do oplodnje (DRUART, 2012.). U *in vitro* protokolima odabiru se morfološki normalni spermiji, koji prolaze proces kapacitacije – ključan za akrosomsku reakciju i oplodnju. GARCÍA

VÁZQUEZ i sur. (2015.) navode da spermiji s većom glavom i duljim repom češće dosegnu mjesto oplodnje. Promjene u morfometriji tijekom kapacitacije dokaz su funkcionalne prilagodbe spermija (GARCÍA-HERREROS i LEAL, 2015., SKOWRONEK i sur., 2024.).

Morfologija i brzina spermija ključne su za oplodnu sposobnost (MALO i sur., 2005., RAMON i sur., 2013., ROS-SANTAELLA i sur., 2014.), iako su rezultati često kontradiktorni (MALO i sur., 2006., MAROTO-MORALES i sur., 2016.). Istraživanja ukazuju da izdužene glave spermija omogućuju bolju hidrodinamiku, povećavajući uspjeh oplodnje (YÁNIZ i sur., 2015.). Morfometrija glave također utječe na strukturu kromatina, ključnu za oplodnu sposobnost (OSTERMEIER i sur., 2001., VALVERDE i sur., 2016.).

Daljnja istraživanja koriste sofisticirane tehnike kako bi utvrdila ključne morfometrijske pokazatelje za uzgoj životinja (MAROTO-MORALES i sur., 2016.). Kombinacija suvremenih tehnoloških dostignuća i statističkih metoda može unaprijediti preciznost procjene morfologije spermija putem morfometrijske analize te u buduću ima potencijal pospješiti kvalitetnije uzgojne programe (ŽURA ŽAJA i sur., 2018., ŽURA ŽAJA i sur., 2025.).

Pretpostavka ovog istraživanja je da postoji povezanost između morfometrijskih pokazatelja spermija (površina, duljina i širina glave i središnjeg dijela spermija, duljina repa i spermija, pravilnost, naboranost, eliptičnost i elongacija glave spermija) s kakvoćom odmrznutoga sjemena jarčeva odnosno kinetičkim pokazateljima spermija. Očekuje se i povezanost dobivenih subpopulacija spermija s pojedinim pokazateljima kakvoće odmrznutoga sjemena.

Cilj je ovog istraživanja utvrditi povezanost morfometrijskih svojstava spermija jarčeva s kinetičkim pokazateljima kakvoće odmrznutoga sjemena.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

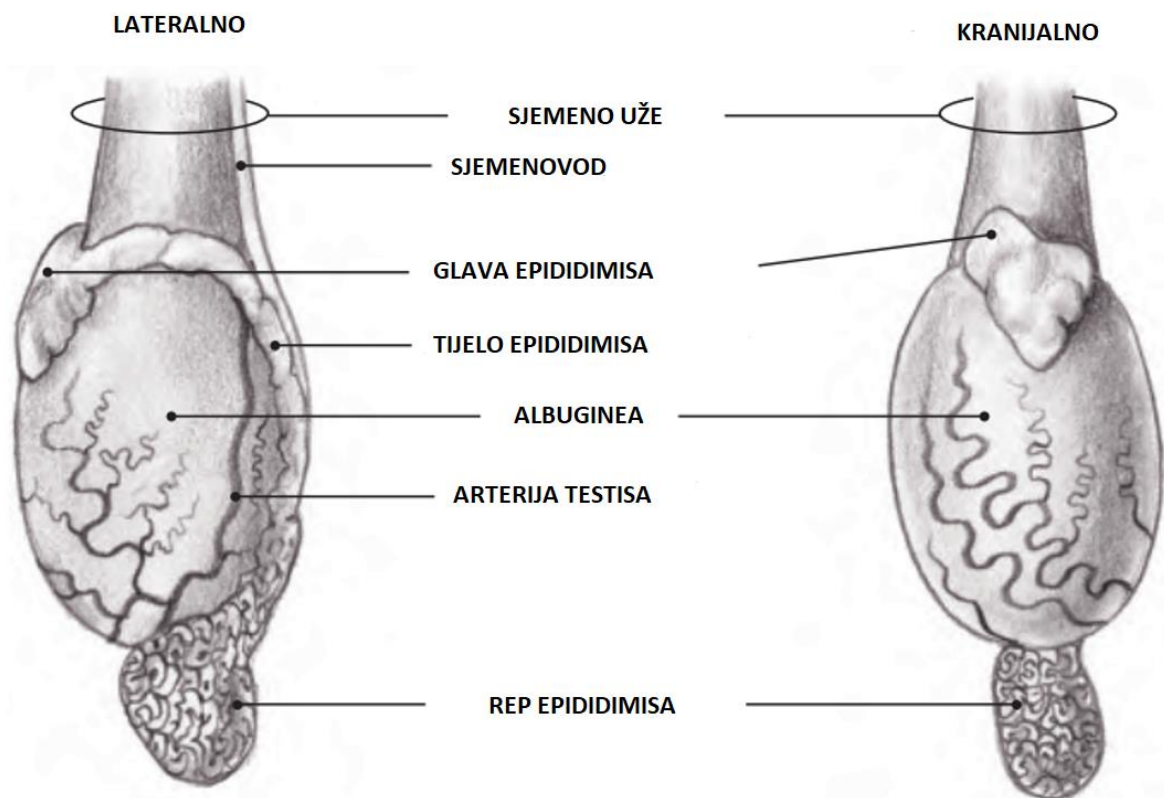
2.1. REPRODUKCIJA JARCA

2.1.1. FUNKCIJSKA ANATOMIJA SPOLNOG SUSTAVA JARCA

Anatomija spolnih organa jarca slična je onima drugih preživača. Sastoji se od tri funkcionalno različite skupine organa: testisi sa slojevima tkiva u kojima se nalaze (tunike testisa), kanali koji vode ejakulat kroz penis i kopulacijski organ (penis) smješten unutar prepucija. Nadalje, u spolnom sustavu mužjaka nalaze se i žlijezde uz mokraćnu cijev.

Testisi su muške spolne žlijezde koje imaju dvije funkcije: proizvodnju spermija (jedan kubni milimetar jarčevog ejakulata sadrži 2 500.000 spermija), sposobnih za oplodnju jajnih stanica i stvaranje „muškog“ spolnog hormona testosterona (CONSTANTINESCU i CONSTANTINESCU, 2010., RANA, 2024.).

Testisi se nalaze izvan tijela unutar visećeg skrotuma. Skrotum se sastoji od valovite epiderme koja može ili ne mora biti prekrivena dlakom. Ispod kože se nalazi razgranat plexus krvnih žila, limfnih žila i znojnih žlijezda. Testisi su jarčeva jajolikog oblika, a smješteni u okomitom položaju unutar ovojnice testisa na ventralnom i kaudalnom dijelu abdomena, u ingvinalnoj regiji (Slika 2.1.). Svaki je testis mase 130 – 160 g, ima glavu usmjerenu dorzalno, a rep ventralno. Nadalje, testisi imaju dvije strane (lateralnu i medijalnu) i dva ruba (slobodni kranijalni i kaudalni gdje je epididimis povezan sa testisom) (Slika 2.1.). Svaki je testis okružen fibroznom ovojnicom koja se naziva tunica albuginea, nije rastezljiva i nastavlja se unutar organa kao interlobularne pregrade. Stroma testisa podijeljena je pregradama na režnjeve. Pregrade se međusobno spajaju i tvore medijastinum testisa. Brojni sjemeni kanalići ispunjavaju režnjiće i međusobno se povezuju unutar medijastinuma testisa u mrežu koja se naziva rete testis (CONSTANTINESCU i CONSTANTINESCU, 2010., RANA, 2024.).



Slika 2.1. Testisi (prema CONSTANTINESCU i CONSTANTINESCU, 2010.)

Testisi su zaštićeni višeslojnim ovojnicaama koje se nazivaju ovojnice testisa. Neke od tih ovojnica nastaju tijekom spuštanja testisa (intrauterino), a ostale ovojnice su modificirana koža i potkožno vezivno tkivo, a svi su funkcionalno i klinički značajni. Ovojnice koje nastaju tijekom spuštanja testisa jesu unutarnja spermatična fascija i vaginalna ovojnice. Spermatična je fascija nastavak endoabdominalne fascije, dok je vaginalna ovojnica nastavak peritoneuma (koji se sastoji od parijetalnog i visceralnog lista). Ovojnice smještene izvan trbušne stjenke su vanjska spermatična fascija (sloj vezivnog tkiva) i modificirana koža (skrotalna koža izvana i tunica dartos iznutra). Tunica dartos čini dvije dartoične vrećice (po jednu za svaki testis), a skrotalna koža okružuje oba testisa i njihove sjemene vrpce (Slika 2.1.) (CONSTANTINESCU i CONSTANTINESCU, 2010., RANA, 2024.).

Dartos, sloj glatkih mišića, povezan je s vaginalnim tunikama testisa putem skrotalne fascije. Skrotalna fascija je vezivno tkivo koje se obično razgrađuje pri odvajanju kože od testisa tijekom rutinske kastracije. Vaginalne tunike su izbočine peritoneuma i čine zaštitnu ovojnicu oko testisa. Prostor između dvaju slojeva vaginalne tunike (parijetalni i visceralni) koji se nalazi oko testisa obično sadrži malu količinu peritonealne tekućine. Skrotalni septum,

koji se većinom sastoji od mišića dartosa, dijeli skrotum na dva dijela (HEATH i PUROHIT,1998., EDMONDSON i sur., 2012., RANA, 2024.).

Sam testis je okružen debelim slojem fibrozog vezivnog tkiva poznatim kao tunica albuginea. Parenhim testisa sastoji se od sjemenovodnih kanalića koji sadrže spolne stanice i njihove potporne stanice (Sertolijeve stanice). Sjemenovodni kanalići nastavljaju se u rete testis, koji završavaju s 10 do 12 eferentnih kanalića. Ovi kanalići se nastavljaju u glavu epididimisa, koja se nalazi na dorzalnom kranio-lateralnom dijelu testisa. Tijelo epididimisa zakreće se oko lateralnog dijela testisa i završava kaudomedijalno kao rep. Tubularna struktura se reflektira dorzalno i postaje vas deferens (CONSTANTINESCU i CONSTANTINESCU, 2010.). Spermatogeneza traje otprilike 49 do 60 dana od početka diobe spolnih stanica do trenutka kada spermiji budu otpušteni iz sjemenovodnih kanalića. Dodatnih 10 dana do 2 tjedna potrebno je da spermiji prođu kroz epididimis (PINEDA i FAULKNER, 1980., EDMONDSON i sur., 2012., RANA, 2024.).

Spolni izlučni prolazi (kanali koji vode ejakulat)

Postoje tri spolna ekskretorna prolaza u jaraca: epididimis, ductus deferens i uretra s dodatnim žlijezdama. Funkcija ovih prolaza je omogućiti spermijima da izađu iz spolnog sustava i budu u stanju oploditi jajne stanice.

Epididimis je pričvršćen za kaudalnu granicu testisa i prekriven je proširenjem tunike albuginee. Počinje glavom koja prekriva glavu testisa, nastavlja se tijelom i završava repom, ventralno. Potom se nastavlja okomito u proksimalnom smjeru s ductus deferensom. Glava sadrži mnogo kanalića (ductuli efferentes), a u nastavku rete testisa. Kanalići se međusobno spajaju i tvore ductus epididymidis, koji prolazi kroz tijela epididimisa. Ovaj kanal postaje vrlo savitljiv i može biti dugačak čak 60 metara. Na bočnoj strani, između testisa i tijela epididimisa nalazi se testikularna burza (CONSTANTINESCU i CONSTANTINESCU, 2010., RANA, 2024.).

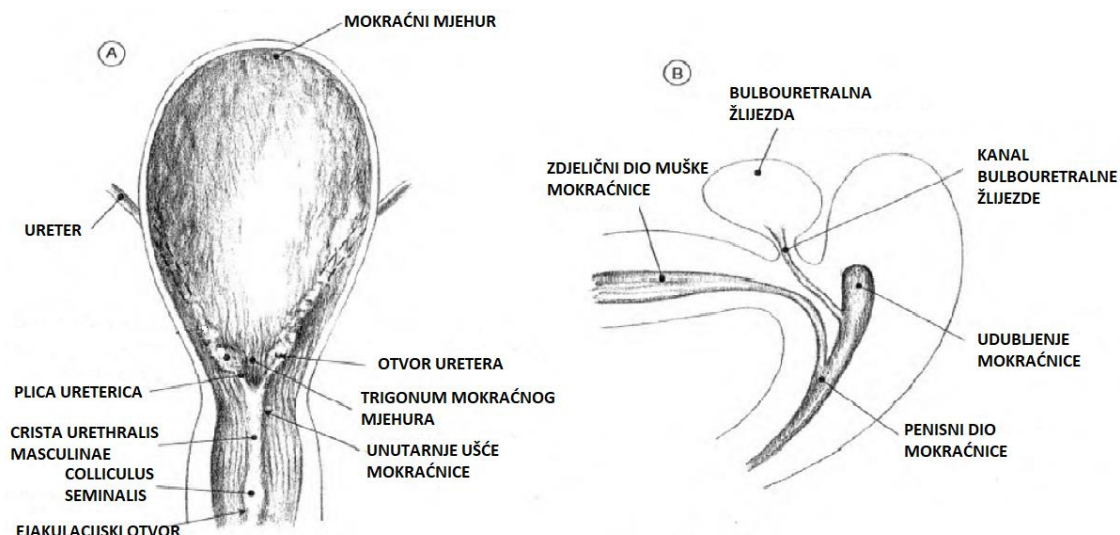
Duktus deferens je nastavak duktusa epididimisa koji počinje od repa epididimisa. To je ravni kanal, uključen u sjemenu vrpцу, ulazi u trbušnu šupljinu i dopire do zdjelične uretre neposredno kaudalno u odnosu na vrat mokraćnog mjehura. Prazni se na gornjem proširenom dijelu uretre (ampula) u sklopu kojega su male žlijezde, lateralno od colliculus seminalis. colliculus seminalis je uzdignuće sluznice uretre, na kraju grebena uretre (Slika 2.2. A).

Sjemenu vrpцу čine ductus deferens, visceralna lamina vaginalne ovojnice te žile i živci koji opskrbljuju testis i epididimis. Ova složena struktura podložna je različitim kirurškim intervencijama i tehnikama koje se koriste za kastraciju, kriptorhizam, ingvinalnu

kilu itd. U jarca su sjemene vrpce dugačke, zbog čega testisi vise tijekom kretanja (RANA, 2024.).

Mokraćna cijev u mužjaka zajednički je izvodni kanal za mokraću i sjeme. Podijeljena je na dva segmenta: zdjeličnu i penilnu uretru. Zdjelična mokraćna cijev nastavak je mokraćnog mjehura koji leži na dnu zdjelične šupljine, obavijen je spužvastom ovojnicom i uretralnim mišićem te se naglo sužava u visini sjednog luka. Ovdje se zdjelična uretra nastavlja kao mokraćna cijev penisa (penilna uretra), prateći uretralni isthmus (uski dio). Penilna uretra je obavijena corpus spongiosumom (spužvasto tijelo) cijelom svojom duljinom. Uretra završava kao crvuljasti nastavak. Krv ulazi u spužvasto tijelo proksimalno i izlazi kroz dvije vene smještene na slobodnom dijelu penisa. Kontrakcije m. urethralis i m. bulbospongiosus uzrokuju da krv ritmički prolazi kroz spužvasto tijelo, stvarajući karakteristično pulsno mokrenje (BECKETT i WOLFE, 1998., CONSTANTINESCU i CONSTANTINESCU, 2010., EDMONDSON i sur., 2012., RANA, 2024.).

Jarci imaju sve dodatne (akcesorne) spolnih žlijezda. Male bulbouretralne žlijezde smještene su kaudalo u zdjeličnoj šupljini, s obje strane pelvične uretre, i mogu se palpirati rektalno. Dodatne žlijezde su prostata, vezikularne žlijezde i bulbo - uretralne žlijezde. Njihova je funkcija proizvesti sjemenu tekućinu za prehranu spermija i olakšati prolazak sperme kroz izlučujuće kanale. U jaraca prostata je diseminirana žlijezda koja u potpunosti okružuje stijenke zdjelične uretre. Mjehuričaste žlijezde su parne, duge 3 – 4 cm, s režnjicama površine i nalazi se s obje strane vrata mokraćnog mjehura. Njihovi kanali otvaraju se na colliculus seminalis. Bulbouretralne žlijezde nalaze se daleko kaudalno, s obje strane istmusa uretre, zaobljene su i male, promjera 1 cm. Njihovi ekskretorni kanali prolaze kroz mokraćnu cijev i otvaraju se izravno u uretralni recesus (Slika 2.2. B) (ASHDOWN i HANCOCK, 1980., CONSTANTINESCU i CONSTANTINESCU, 2010., EDMONDSON i sur., 2012., RANA, 2024.).



Slika 2.2. Mokraćni mjehur i uretra u mužjaka: A. Gornji dio mokraćnog mjehura i muške uretre; B. Urethralni recesus u preživača (prema CONSTANTINESCU i CONSTANTINESCU, 2010.).

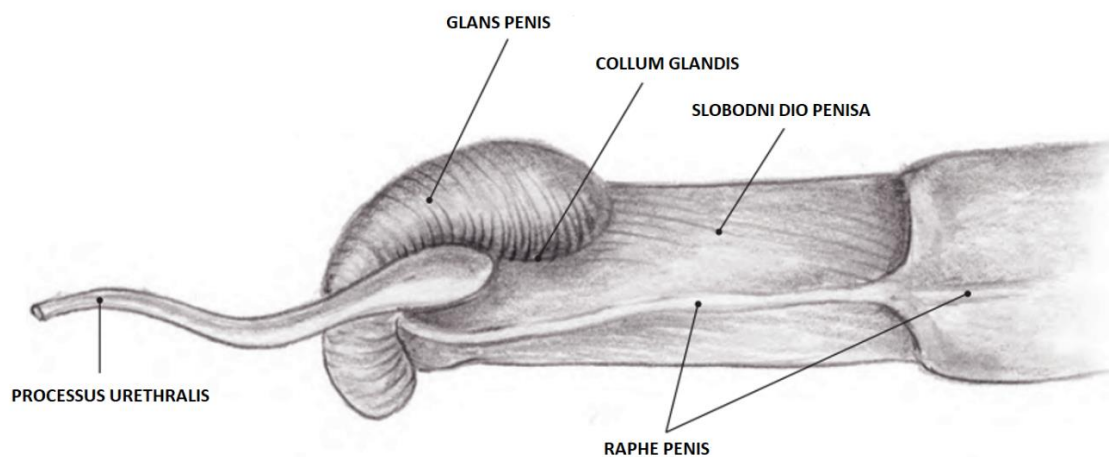
Penis

Muški kopulacijski organ, penis, sastoji se od korijena, tijela i vrha. Jarac ima fibroelastični penis, koji je još uvijek čvrst kada nije u erekciji. Najistaknutija struktura penisa je corpus cavernosum (šupljikavo tijelo). Sastoji se od šupljih prostora podržanih fibroznim trabekulama. Ova šuplja tkiva smještena su na dorsalnoj površini i djelomično okružuju spužvasto tijelo. Na svom početku u zdjelici, šupljikavo tijelo se sastoji od dva kraka koji se spajaju prije izlaska iz zdjelice. Cijeli penis okružen je tunica albugineom. Dva para mišića retractor penisa polaze od kokcigealnih kralježaka i prolaze oko anusa kako bi postali dva odvojena mišića koja se pričvršćuju za ventrolateralnu površinu penisa na distalnom zavoju sigmoidne fleksure. Penis je obično S oblika (sigmoidna fleksura), osim tijekom erekcije i ejakulacije, zbog djelovanja m. retractor penis (BECKETT i WOLFE, 1998., EDMONDSON i sur., 2012.). Njegova funkcija je omogućiti izbacivanje urina i sperme, a što se postiže refleksima i kontrakcijom mišića penisa. Prosječna duljina penisa u jarca je 40 cm. Polazeći od ishijatičnog luka, penis se proteže kranijalno i prolazi između bedara ventralno prema zdjelici i između dvije sjemene vrpce, okružene kožom i fascijama. Na ventralnoj strani trbušne šupljine, slobodni dio penisa zaštićen je unutar prepucijuma. Slobodni dio penisa pripada tijelu penisa (CONSTANTINESCU i CONSTANTINESCU, 2010., RANA, 2024.).

Korijen penisa sastoji se od dva kraka (crura) i između njih bulbosa penisa. Kraci su pričvršćeni na ishijatični luk, a pokriveni su s dva simetrična mišića koji djeluju na erekciju

penisa. Bulbus penisa je kaudalno proširenje corpus spongiosum penisa, koje je erektilno tkivo penisa. Prekriva ga mišić. Tijelo penisa sastoji se od parnog corpus cavernosum penisa (svako od njih je nastavak odgovarajućeg crus penisa) i penilne uretre okružene corpus spongiosum penis. Izraz „kavernozno tijelo“ koristi se za jedinstvenu strukturu kao rezultat spajanja uparenog kavernoznog tijela. Corpus cavernosum i penilna uretra s corpus spongiosum penis okruženi su dvjema odvojenim tunica albuginea. Albuginea šalje unutar kavernoznog tijela nekoliko pregrada i trabekula koje čine karakterističan okvir za krvne žile. Prostori omeđeni okvirom nazivaju se kaverne. Na ventralnoj strani kavernoznog tijela nalazi se uretralni žlijeb, koji štiti prolaz uretre penisa. Tijelo penisa je dvostruko (u obliku slova S) savijeno prije nego što dosegne razinu sjemenih vrpca. Prva fleksura je dorzalna u odnosu na drugu. Postoji upareni mišić povezan s ventralnim dijelom tijela penisa, koje potječe iz kaudalnih kralježaka. Spaja se na ventralnu fleksuru i nastavlja kranijalno smanjujući se u veličini i nestajući prije nego što dosegne glavić penisa. Uretra penisa prelazi glans penisa uretralnim nastavkom, duljine 2,5 cm (Slika 2.3.).

Glans penisa je prošireni kraj slobodnog dijela penisa, sadrži corpus spongiosum glandis, a vratom je oštro odvojena od slobodnog dijela penisa (CONSTANTINESCU i CONSTANTINESCU, 2010., RANA, 2024.).



Slika 2.3. Lijeva strana penisa jarca (prema CONSTANTINESCU i CONSTANTINESCU, 2010.).

Prepucij

Koža ventralne strane trbuha okružuje i štiti slobodni dio penisa pod nazivom prepucij. Ovaj dio prepucija naziva se vanjska prepucijalna lamina. Koža se nalazi unutar prepucijalne

šupljine na prepucijalnom otvoru i nastavlja se s unutarnjom prepucijalnom laminom, koja se pričvršćuje na slobodni dio penisa i nastavlja kranijalno s kožom penisa (uključujući šavnu liniju koja se naziva „raphe penis“) (Slika 2.3.) i glavićem penisa. Prepucijalni otvor ima obilje dlačica. Postoje kranijalni i kaudalni prepucijalni mišići koji pokreću prepucij tijekom mokrenja (CONSTANTINESCU i CONSTANTINESCU, 2010., RANA, 2024.).

2.1.2. PRIMJENJENA FIZIOLOGIJA SPOLNOG SUSTAVA JARCA

Neuro-endokrina kontrola funkcije testisa slična je onoj u ženki, odnosno uključuje iste hormone. Folikulo stimulirajući hormon (FSH), hormon koji stimulira spermatogenezu i luteinizirajući hormon (LH), hormon koji stimulira intersticijske stanice u mužjaka. To su dva gonadotropna hormona koja su prvenstveno odgovorna za spermatogenezu u kanalićima sjemenovoda i proizvodnju testosterona u Leydigovim stanicama. Ukratko, proces spermatogeneze odvija se unutar muških zametnih stanica u sjemenim kanalićima testisa. Spermatogeneza ima tri faze: proliferacija spermatogonija, mejoza i metamorfoza, tijekom koje spermatide nastale mejozom sazrijevaju tijekom spermiogeneze. Spermatogeneza pod kontrolom je ključnih hormona, uključujući gonadotropine (FSH i LH), androgene, testosteron i inhibin. Testosteron koji proizvode Leydigove stanice djeluje na Sertolijeve stanice, učinkovito stimulirajući spermatogenezu, pa svaki prekid u proizvodnji ili funkciji testosterona značajno utječe na proizvodnju i funkciju spermija (SHARPE, 1987., THOMPSON i sur., 2018.). Fotoperiodička kontrola spolne aktivnosti u jaraca manje je izražena nego u koza (RANA, 2024.).

Neki istraživači tvrde da proizvodnja sperme (ne toliko kakvoća ejakulata) ovisi o sezonskim promjenama. Međutim, to nije uvijek slučaj. Utvrđeno je da je gubljenost spermija bila manja od lipnja do listopada (od početka zime do sredine proljeća) u Boer i Angora jaraca u Južnoj Africi. Spermatogeneza, odnosno tvorba spermija, općenito je dugotrajan proces, koji traje približno 50 do 60 dana (od spermatogonija do tvorbe spermija) i uključuje različite faze (spermatocitogeneza i spermiogeneza) u sjemenim kanalićima. Kada spermatogeneza bude završena, spermiji se premještaju u epididimus gdje sazrijevaju tijekom 2 do 3 tjedna. Dakle, za proizvodnju zrelih odnosno za oplodnju sposobnih spermija potrebno je 60 do 80 dana. U slučaju privremene sterilnosti (na primjer, zbog groznice nakon cijepljenja protiv plavog jezika), treba imati na umu vrijeme potrebno za potpunu spermatogenezu kako bi se postigla optimalna oplodnja (GREYLING i GROBBELAAR, 1983., GREYLING i GROBBELAAR, 1988., JAINUDEEN i sur., 2000., SALAMON i MAXWELL, 2000., GREYLING, 2010., RANA, 2024.).

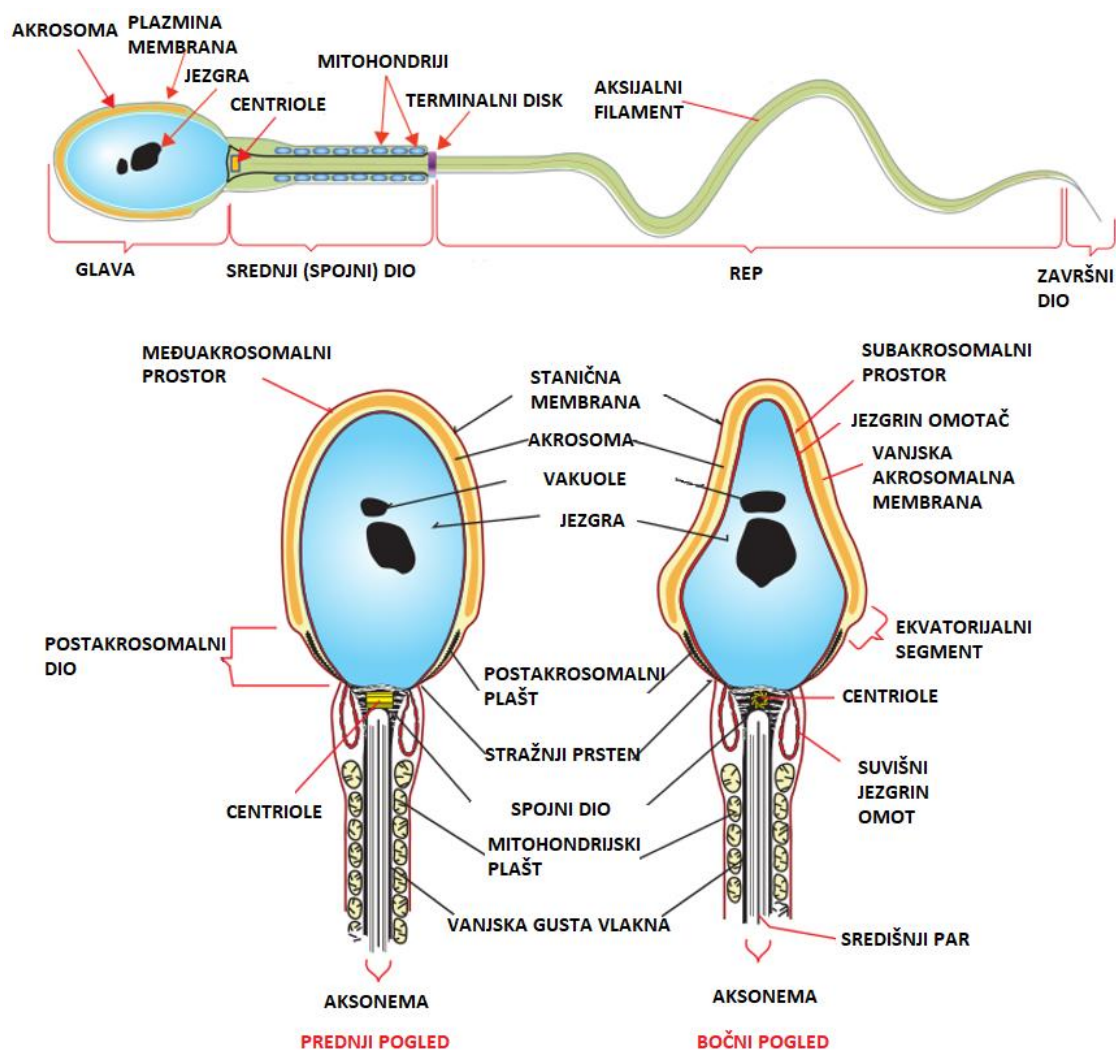
Spermiji u lumenu sjemenih kanalića, koji zatim prolaze kroz epididimise/nuzjaja, mokraćnicu i ženski spolni sustav, podliježu različitim maturacijskim, fiziološkim i biokemijskim promjenama koje im omogućuju oplodnju jajne stanice. Na tom putu razni nepovoljni vanjski čimbenici (kao što su reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), temperatura, ionizirajuće zračenje, kemikalije i sl.) mogu negativno utjecati na spermije (KAYA i sur., 2014.).

Iako su spermiji specifični po obliku i veličini za svaku vrstu, općenito su strukturalno slični (SULLIVAN, 1978.). Svi spermiji dijele zajedničku strukturu koja se sastoji od glave koja sadrži jezgru, srednjeg dijela bogatog mitohondrijima i jednog bičastog repa (flageluma). Međutim, relativne duljine ovih triju komponenti, zajedno s oblikom glave i načinom pokretanja, mogu se znatno razlikovati među vrstama (THOMPSON i sur., 2018.).

Glava je ovalnog oblika i ima jasno definirana dva segmenta. U prednjem dijelu nalazi se akrosoma, dok je u stražnjem dijelu post-akrosomsko područje. Spojni dio između njih naziva se nuklearni prsten (KAYA i sur., 2014.). Glava predstavlja jezgru stanice, koja sadrži tanki sloj protoplazme u kojoj se nalazi kondenzirana DNK i specifični proteini (WARD i COFFEY, 1991., HAZZOURI i sur., 2000.). Akrosoma se formira iz Golgijevog aparata tijekom ranih faza spermiogeneze, sadrži vanjsku i unutarnju membranu, te pokriva oko 60 % glave spermija (Slika 2.4.). Ona sadrži specifične enzime poput hijaluronidaze, proarkozina, acrozina, esteraza, neuraminidaze, kisele fosfataze, fosfolipaza, arilfosfataze, β -N-acetilglukozaminidaze, arilaminidaze, kolagenaze i enzime za penetraciju korone. Hijaluronidaza sudjeluje u probavi cumulus oophorus, dok enzimi za penetraciju korone omogućuju prodiranje kroz corona radiata, a akrozin i neuraminidaza omogućuju penetraciju zona pellucida (KAYA i sur., 2014., BERTA, 2018.).

Rep se sastoji od nekoliko dijelova: spojnog dijela ili vrata, srednjeg dijela ili tijela, glavnog dijela i završnog dijela, koji izgleda poput kista s 9 do 12 dlačica. Kratak vrat čini capitulum (proteinskog podrijetla), koji se oblikom uklapa u implantacijsku udubinu na glavi spermija, a na njega se veže aksonema, koja se proteže gotovo cijelom dužinom repa. Središnji dio aksoneme sastoji se od para mikrotubula obavijenih devet parova mikrotubula i vanjskim omotačem od gustih proteinskih vlakana. Sve ove strukture obavija fibrozni omotač (EDDY, 2006.). U srednjem dijelu, koji se proteže od kraja vrata do prstena koji dijeli središnji i glavni dio, nalazi se vanjski omotač aksoneme od gustih vlakana, koji je obavijen gusto zbijenim mitohondrijima. Glavna funkcija mitohondrija je generiranje energije potrebne za gibanje spermija. Duljina pokrivenosti mitohondrijima i njihov broj variraju ovisno o vrsti. Glavni dio repa je najduži i karakterizira ga gubitak fibroznog omotača, čiji izostanak omogućava bolju

gibljivost i fleksibilnost tog dijela repa (Slika 2.4.)(KAYA i sur., 2014., BERTA, 2018., THOMPSON i sur., 2018.).



Slika 2.4. Dijagram spermija (preuzeto s <https://hr.wikipedia.org/wiki/Spermij>)

Ejakulat, sjeme ili sperma je viskozna tekućina koja se sastoji od dvije komponente: stanične (spermiji) i tekuće (sjemena plazma). Volumen ejakulata specifičan je za svaku vrstu, a u jarčeva u prosjeku iznosi 1 ml. Stanična komponenta, koja uključuje spermije, naziva se spermatokrit, a u jarčeva iznosi više od 30 %, dok koncentracija spermija u jednom mililitru sjemena iznosi 2-5 milijardi. Plazma se sastoji od 91,5 % vode i 8,5 % otopljenih tvari (organskih tvari: albumini, globulini, fibrinogen, ugljikohidrati, masti, hormoni, vitamini, enzimi itd. i anorganskih tvari: anioni i kationi). U sjemennoj plazmi, osim spermija, nalaze se epitelne stanice sluznica odvodnih puteva, leukociti, ugljikohidrati, proteini, aminokiseline, specifične dušične komponente i lipidi (SETCHELL, 2014.). SPRECHER i sur. (1999.)

dokazali su da količina leukocita nije u korelaciji s primarnim patološkim oblicima spermija ili količinom prisutnih patogena koja pogađaju spolni sustav. Za razliku od najprisutnijeg ugljikohidrata u krvnom serumu, odnosno glukoze, u sjemennoj plazmi u najvećoj koncentraciji nalazi se fruktoza koju luče sjemene vrećice (mjehuričaste žlijezde). Uz fruktozu i glukozu, u sjemennoj plazmi se nalazi i inozitol. Nuzjaja izlučuju proteine sjemene plazme koji sudjeluju u procesu oplodnje (SETCHELL, 2014., BERTA, 2018.).

Od posebne važnosti je proteina spermozin koji ima sličnu funkciju kao miozin u mišićima, jer sudjeluje u pretvaranju kemijske energije u mehaničku, čime omogućuje gibanje spermija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Aminokiseline specifične za sjemenu plazmu su glutaminska kiselina, glicerofosforilkolin, hipotaurin (u prevenciji oštećenja stanica od ROS-a), karnitin, glicerilfosforilinozitol, betain i drugi (SETCHELL, 2014.). Fosfatidalkolin (fosfolipid-kolin plazmalogen) je najznačajniji fosfolipidima u jarčevoj sjemennoj plazmi, koji ima višestruko nezasićene masne kiseline koje su podložne koje su podležne na djelovanje prekomjerno stvorenih ROS. Fosfolipidi imaju ključnu funkciju jer djeluju kao prekursori trombocit-aktivirajućeg faktora, koji je važan za gibanje spermija i akrosomsku reakciju. Od steroida, najvažniji su progesteron, dihidrotestosteron, androstanedioli, estrogeni, testosteron i prostaglandini (SETCHELL, 2014.). Prostaglandini su otkriveni 1930. godine, a naziv su dobili jer se smatralo da ih proizvodi prostata, iako je kasnije dokazano da nastaju u sjemenim vrećicama, posebno u jarčeva i bikova (BERTA, 2018.). GANJAM i AMANN (1976.) dokazali su da je koncentracija testosterona u sjemennoj plazmi jednaka onoj u krvnoj plazmi.

Tehnika prikupljanja sperme također je važan aspekt pri određivanju kakvoće sjemena (Tablica 2.1. i Tablica 2.2.). Prihvaćeno je da gibljivost spermija i postotak živih spermija određuju kakvoće sperme. Gustoća ili koncentracija ejakulata i postotak živih spermija veći su u spermi prikupljenoj pomoću umjetne vagine. Međutim, konačni i najvažniji kriterij u procjeni kakvoće sperme je u oplodnoj sposobnosti spermija (GREYLING i GROBBELAAR, 1983., KARAGIANNIDIS i sur., 1999., BARKAWI i sur., 2006., GREYLING, 2010.).

Tablica 2.1. Srednje kvadratne vrijednosti ($\pm$ SE) standardnih pokazatelja ejakulata u Zaraibi jarčeva pod utjecajem godišnjeg doba.

Osobina	Broj životinja	Jesen	Zima	Proljeće	Ljeto	Srednja vrijednost
SC (cm) ¹	10	25,4 $\pm$ 0,22 ^c	25 $\pm$ 0,25 ^c	26,2 $\pm$ 0,34 ^b	27,3 $\pm$ 0,27 ^a	25,9 $\pm$ 0,14
Volumen ejakulata (ml)	9	0,98 $\pm$ 0,03 ^a	0,56 $\pm$ 0,03 ^c	0,35 $\pm$ 0,05 ^d	0,91 $\pm$ 0,03 ^b	0,75 $\pm$ 0,02
Koncentracija ($\times 10^6$ /ml)	8	4,700 $\pm$ 10,1 ^b	5,288 $\pm$ 12,7 ^a	4,903 $\pm$ 18,4 ^a	4,783 $\pm$ 9,9 ^b	5,072 $\pm$ 5,48
Ukupna proizvodnja spermija ($\times 10^6$)	8	4 565 $\pm$ 15,6 ^a	3 013 $\pm$ 19,1 ^b	1 791 $\pm$ 28,6 ^c	4 429 $\pm$ 15,4 ^a	3 782 $\pm$ 9,17
pH	8	6,69 $\pm$ 0,03 ^b	6,68 $\pm$ 0,03 ^b	6,79 $\pm$ 0,04 ^b	6,79 $\pm$ 0,03 ^a	6,72 $\pm$ 0,01
Masivna gibljivost spermija	8	4,3 $\pm$ 0,08 ^a	4,3 $\pm$ 0,09 ^a	3,7 $\pm$ 0,13 ^b	4,3 $\pm$ 0,08	4,2 $\pm$ 0,04
Progresivna gibljivost spermija (%)	8	79,5 $\pm$ 1,37 ^a	80,3 $\pm$ 1,68 ^a	73,1 $\pm$ 2,5 ^b	81,2 $\pm$ 1,35 ^a	78,9 $\pm$ 0,69
Živi spermiji (%)	8	82,5 $\pm$ 0,83 ^b	77,2 $\pm$ 1,02 ^c	76,4 $\pm$ 1,5 ^c	87,2 $\pm$ 0,82 a	81,8 $\pm$ 0,45
Patološki oblici spermija (%)	8	8,8 $\pm$ 0,46 ^c	18,3 $\pm$ 0,56 ^a	17,9 $\pm$ 0,84 ^a	11,4 $\pm$ 0,46 ^b	13,5 $\pm$ 0,29
Indeks ejakulata ($\times 10^6$) ²	8	3 152 $\pm$ 13,2 ^a	1 982 $\pm$ 16,2 ^b	1 139 $\pm$ 24,1 ^c	3 354 $\pm$ 13,0 ^a	2 630 $\pm$ 7,63

^{a,b,c,d} Unutar stupaca, različita slova (a – d) označavaju statistički značajne razlike ($P < 0,01$).

¹ SC, skrotalni opseg

² Indeks ejakulata = volumen sjemena $\times$ koncentracija $\times$ živi (%) $\times$ progresivna gibljivost (%)

Izvor: BARKAWI i sur. (2006.)

Tablica 2. Korelacijski koeficijenti standardnih pokazatelja ejakulata s mjerama testisa i tjelesnom masom u jaraca pasmine Rayini.

Karakteristike sjemena	Opseg skrotuma	Širina testisa	Dužina testisa	Tjelesna masa
Volumen sjemena	0,85***	0,79**	0,51	0,73**
Koncentracija spermija	0,32	0,36	0,54*	0,35
Postotak živih spermija	0,13	0,10	-0,04	0,01
Postotak patoloških oblika spermija	-0,16	-0,16	-0,15	0,01
Ukupan broj spermija	0,86***	0,83***	0,63*	0,76**
Broj živih spermija	0,71**	0,66**	0,45	0,61*
Broj živih i normalnih spermija	0,75***	0,72**	0,52	0,63*

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; Izvor: ZAMIRI i sur. (2006.)

2.1.3. PUBERTET JARCA

U jaraca, početak puberteta povezan je s značajnim povećanjem proizvodnje testosterona i kasnijom spermatogenezom. Ovaj fenomen događa se u dobi jarčeva od 4 – 6 mjeseci. Čimbenici koji utječu na početak puberteta uključuju fotoperiod i prehranu. Spolna

zrelost (kada se jarci mogu koristiti za parenje) obično nastupa oko 18 mjeseci starosti (60 – 80 kg, ovisno o pasmini).

I unutarnji i vanjski podražaji utječu na vrijeme početka puberteta, a teško je izdvojiti samo jedan čimbenik koji je jedini odgovoran za puberte. Općenito, proces spolne zrelosti uključuje niz događaja, a može postojati interakcija između učinka mužjaka, sezonalnosti i prehrane (GREYLING, 1996., NISHIMURA i sur., 2000., TODINI i sur., 2007., GREYLING, 2010., LEDEZMA-TORRES i sur., 2022., UNGERFELD i sur., 2023.).

Pasmina, dob i ishrana doprinose početku spolne zrelosti jarca. Dob puberteta ovisi o pasmini, a u nekim pasminama počinje od 2 do 3 mjeseca (SMITH i SHERMAN, 1994., SANCHEZ-DAVILA i sur., 2020.). Nubijski i Boer jarci počinju pokazivati spolna ponašanja (povišenje libida) u dobi od 10 do 12 tjedana i počinju proizvoditi kvalitetnu spermu otprilike u 8. mjesecu života. Plodno parenje moguće je u dobi od 4. do 5. mjeseca jarca (SMITH i SHERMAN, 1994., GOYAL i MEMON, 2007.). Brzo rastući, dobro hranjeni i dobro držani jarci mogu se pariti ranije od pothranjenih mužjaka iste dobi (EDMONDSON i sur., 2012.).

Izvan sezone parenja, mnogi jarci imaju smanjen libido, smanjeno izlučivanje feromona, smanjeni opseg skrotuma, manju vitalnosti spermija nakon smrzavanja i veći broj patoloških oblika spermija. Sve navedene promjene posljedica su manje razine LH i testosterona. Koncentracija LH i testosterona, libida i prisutnost mirisa u jarca dosežu vrhunac u jesen (HILL, 1996., WILDDEUS, 1998.). Spolno ponašanje jarca uključuje aktivno traženje koza u estrusu, udvaranje (udaranje, kopanje, udaranje njuškom, ricanje i flehmenov refleks), zaskakivanje, penetraciju i ejakulaciju. Ejakulacija se događa spontano i karakterizira je snažan potisak zdjelice s brzim pomakom glave unatrag (GOYAL i MEMON, 2007.). Nakon ejakulacije, jarac silazi i ne pokazuje spolnu uzbuđenost od nekoliko minuta do nekoliko sati (EDMONDSON i sur., 2012.).

Za većinu pasmina koza koje se uzgajaju u umjerenoj klimi sjeverne hemisfere, spermiji su prisutni u ejakulatu jarčeva u dobi od 4. do 5. mjeseca. Međutim, u ovoj dobi kvaliteta ejakulata je loša i životinje nisu pogodne za uzgoj (EDMONDSON i sur., 2012., RANA, 2024.).

2.1.4. SEZONALNOST I SEZONA PARENJA

Na sezonu parenja utječu različiti klimatski čimbenici (kao što su temperatura i fotoperiod) koji reguliraju fiziološki odgovor. Duljina sezone parenja prvenstveno je rezultat genetskih i okolišnih interakcija. Sezona parenja počinje kada duljina dana postane kraća.

Postoje dokazi koji upućuju na to da je u nekim vrstama epifiza, kroz lučenje melatonina, uključena u posredovanje učinaka fotoperioda na funkciju gonada. Razine melatonina su visoke tijekom tamnih razdoblja, a niske tijekom svijetlih razdoblja. Također postoje dokazi da je predmaksilarno područje hipotalamusa važno ciljno mjesto za melatonin kako bi regulirao spolnu aktivnost (HUNTER, 1980., ZARAZAGA i sur., 2005., GREYLING, 2010., RANA, 2024.).

Različite pasmine imaju različite dužine sezone parenja. Na primjer, koza pasmine Angora ima kratku sezonu parenja, koja varira između 94 dana (ili 4 – 7 estrusnih ciklusa) i $117 \pm 3,5$ dana. Uvođenje jarca među koze može se koristiti kao metoda za ubrzanje početka sezone parenja i za sinkronizaciju estrusa među kozama. Čini se da su koze pasmine Boer sezonski poliestrične, iako nisu zamjećeni periodi potpune anestrusnosti. Uzorak sezonskog pojavljivanja spolne aktivnosti za odraslu kozu pasmine Boer i mladu kozu (u dobi od 5 – 17 mjeseci) vrlo je sličan. Vrhunac spolne aktivnosti događa se tijekom jeseni ili razdoblja kratke duljine dana, dok razdoblje najmanje seksualne aktivnosti traje od kasnog proljeća do sredine ljeta. Prosječan broj estrusnih razdoblja godišnje po kozi za pasminu Boer iznosi $11,7 \pm 4,4$ (otprilike 280 dana). Preporučuje se jedan jarac na 35 – 40 koza kada se primjenjuje parenje u stadu, a važno je nastojati pariti mlade koze (neparene) odvojeno od zrelih koza (DEVENDRA i BURNS, 1983., RESTALL, 1992., AHMED i sur., 1997., RIVERA i sur., 2003., GREYLING, 2010., RANA, 2024.).

Općenito, jaraci ne pokazuju tako izraženu sezonu parenja, iako postoji tendencija da smanjenje fotoperioda (duljina dana) stimulira lučenje FSH, LH i proizvodnju testosterona. Neke pasmine jaraca poput Angora osjetljivije su na duljinu dana i stoga imaju izraženiju sezonalnost (GREYLING i GROBBELAAR, 1983., BARKAWI i sur., 2006., TODINI i sur., 2007., GREYLING, 2010., RANA, 2024.).

2.1.5. MENADŽMENT JARCA

Važnost jarca u cijelom programu uzgoja ne smije se podcijeniti. Iako se koristi samo aktivno oko 6 tjedana u sustavu parenja sa stadom ili intenzivno tjedan ili dva kada se koristi u programu umjetnog osjemenjivanja, te jarac mora biti pravilno korišten.

Od trenutka odvajanja od majke s 3 mjeseca starosti, nakon potrebnog tretmana antiparazitcima i cijepjenja prema preporukama veterinara, mužjaci bi trebali biti na prehrani koja osigurava energiju iznad razine održavanja. Prosječna tjelesna masa jaraca pasmine Boer u dobi od 100 dana (obiće) je 27 kg, a tjelesna masa u dobi od 12, 18, 24 i 36 mjeseci iznosi 55 kg, 75 kg, 88 kg i 115 kg, redom kako slijedi. Prihvatljive tjelesna performanse, veličina i

izgled preduvjeti su kada se koriste za uzgoj. Općenito, jarci bi trebali biti održavani u dobrom tjelesnom stanju prema ocjenama tjelesne kondicije tijekom cijele godine (3 od ukupno 5). Od 2 do 3 tjedna prije sezone parenja, jarčeve bi prije sezone parenja trebalo dodatno dohranjivati kako bi se unijela veća količina energije u organizam. Sva potrebna godišnja cijepljenja trebaju biti provedena najmanje 6 tjedana prije planirane sezone parenja, a papci trebaju biti podrezani kako bi se olakšalo hodanje i mogućnost parenja. Tijekom kišne sezone preporučuje se tretman namakanja papaka za prevenciju truleži papaka svaka 3 do 4 tjedna. Tretman protiv unutarnjih parazita također treba biti provedeno 1 do 2 tjedna prije parenja. Najznačajnija rutinska procjena jaraca koja se treba provesti prije parenja je testiranje plodnosti (ejakulat i konzistencija skrotuma) te testiranje na spolno prenosive bolesti (bruceloza). Ovi testovi se obično provode unutar 30 dana od početka sezone parenja (SMITH, 1980., GALL, 1981., DEVENDRA i BURNS, 1983., BATH i DE WET, 2000., GREYLING, 2010., RANA, 2024.).

2.1.6. Procjena spolne sposobnosti jarca

Svi jarčevi koji će se koristiti za parenje trebaju biti procijenjeni na spolnu sposobnost 3 do 4 tjedna prije početka sezone parenja. Pregled jarca trebao bi uključivati klinički pregled, pregled spolnog sustava, mjerenje opsega skrotuma te prikupljanje i procjenu ejakulata. Procjena spolne sposobnosti jarca odnosi se na mogućnost procijene samo tjelesne sposobnosti i kakvoću ejakuta jarca. Zadovoljavajuća ocjena ne može jamčiti sposobnost jarca da proizvede žive potomke (PUGH, 1996., GOYAL i MEMON, 2007.). Pokušaji procjene libida u jarca značajno pomažu u potpunoj sponoj procjeni (GOYAL i MEMON, 2007., EDMONDSON i sur., 2012.).

Klinički pregled

Klinički pregled jarca mora uključivati opći pregled zdravlja, s posebnim naglaskom na procjenu tjelesne kondicije i muskulature (noge i papke). Da bi bio zadovoljavajući za parenje, jarac bi trebao biti u dobroj tjelesnoj kondiciji. Upotreba previše mršavih ili prekomjerno debelih životinja treba se izbjegavati za parenje (PUGH, 1996., MEMON i sur., 2007.). Jarac treba biti bez poznatih genetskih mana, poput kila, deformacije čeljusti, kriptorhizma, suvišnih bradavica i interseksualnih stanja (EDMONDSON i sur., 2012.).

Pregled spolnog sustava

Pregled spolnog sustava uključuje procjenu testisa, epididimisa, sjemenovoda i penisa.

Testisi se trebaju pregledati prema veličini, simetriji, a vrh penisa (otprilike 2 do 3 cm) formira uretralni proces. U jarčeva koji su imali urinarne kamence, uretralni proces obično se uklanja tijekom liječenja jer su uretralni proces česta zona opstrukcije. Gubitak ili uklanjanje uretralnog procesa nema negativan utjecaj na plodnost jarca (EDMONDSON i sur., 2012.).

Jarac treba imati dva velika, ovalna testisa iste veličine, oni su čvrsti tijekom sezone parenja i nešto mekši izvan sezone parenja. Ako je prisutan samo jedan testis, mužjak treba biti izlučen iz uzgoja. Ultrazvučna dijagnostika može biti korisna u otkrivanju ili potvrdi patoloških stanja spolnih organa mužjaka (PUGH, 1996., CARSON i sur., 1997., MEMON i sur., 2007.).

Vidljive promjene na epididimisu su relativno rijetke u jarčeva. Veterinar treba pregledati penis na patološke oblike prilikom prikupljanja uzorka ejakulata. Penis se mora ručno produžiti iz prepucija kako bi se omogućio pažljiv pregled (MEMON i sur., 2007., EDMONDSON i sur., 2012., RANA, 2024.).

Uzimanje ejakulata

Ejakulat se može prikupiti pomoću umjetne vagine u naviknutog jarca ili putem elektroejakulacije (CARSON i sur., 1997.). Elektroejakulatori trebaju biti dugi 25 do 30 cm i promjera 2 do 3 cm. Umjetna vagina može se izraditi od cijevi od polivinil klorida ili sličnih crijeva s unutarnjim oblogom izrađenom od presjeka biciklističke unutarnje gume. Umjetna vagina također se može kupiti. Duljina umjetne vagine treba biti 18 do 22 cm, a vanjski promjer 6 cm. Treba je napuniti toplom vodom kako bi se održao odgovarajući tlak i temperatura (38 do 40 °C). Na jedan kraj treba postaviti konus (baždarenu epruvetu) za prikupljanje ejakuta. Nespremični lubrikant stavlja se na otvoreni kraj.

Za postupak elektroejakulacije, jarci se drže u kavezima ili pritisnuti uz zid. Rektum se čisti od izmeta, a dobro podmazana sonda se umetne. Prostata se masira pet do šest puta, električna struja se primjenjuje kroz sondu 4 do 6 sekundi, a zatim se sonda isključi na 3 do 4 sekunde. Ovaj se obrazac ponavlja dok ne dođe do ejakulacije (obično četiri do pet ciklusa). Libido se ne može procijeniti kada se ejakulat prikuplja pomoću elektroejakulacije. Tijekom i nakon prikupljanja, ejakulat treba biti zaštićeno od izravne sunčeve svjetlosti i temperaturnog šoka, a gibljivost spermija treba se procijeniti unutar 10 minuta (GOYAL i MEMON, 2007.).

2.2. PROCJENA EJAKULATA

Mnogi laboratoriji širom svijeta analiziraju karakteristike kakvoće sjemena (uključujući volumen, koncentraciju spermija, boju, gustoću i viskoznost) i posebno, kakvoću spermija (uključujući masivnu i progresivnu gibljivost (ROSSITTO i sur., 2019.), procjenu udjela

morfoloških patoloških oblika spermija (AMANN i sur., 2000.), a samo poneki laboratorii mitopotencijal (BUCAK i sur., 2015.), osjetljivost na oksidaciju (PARTYKA i sur., 2011.) i fragmentaciju DNK-a (CASTRO i sur., 2018., O'MEARA i sur., 2022.).

Standardno se ejakulat procjenjuje prema boji i karakteristikama spermija, uključujući masivnu i progresivnu gibljivost, morfologiju i koncentraciju. Kakvoća i količina ejakulata mogu varirati ovisno o dobi, sezoni, temperaturi, pasmini, pa čak i među pojedinačnim životinjama unutar iste pasmine.

Normalne vrijednosti za procjenu sjemeni u jarca su sljedeće:

Volumen sjemeni: 1 mL (s rasponom od 0,5 do 1,5 mL)

Gibljivost spermija: 80 % (s rasponom od 70 % do 90 %)

Koncentracija spermija: 4 milijarde (s rasponom od 2 do 5 milijardi)/mL

Normalna morfologija spermija: 80 % (s rasponom od 70 % do 90 %)

Volumen ejakulata mjeri se izravno iz mjernog spremnika za skupljanje sjemeni (kalibrirane epruvete). Iako je volumen koristan pokazatelj pri procjeni ejakulata prikupljenog pomoću umjetne vagine, njegova je vrijednost ograničena pri uporabi elektroejakulatora. Boja ejakulata ovisi o koncentraciji spermija po mililitru i može varirati od prozirne tekućine slične sirutki, preko mliječnog izgleda, pa sve do kremaste teksture (EDMONDSON i sur., 2012.).

Gibljivost spermija procjenjuje se tako da se kap svježeg ejakulata prvo pregledava pod malim povećanjem (100×) kako bi se procijenila koncentracija i gibljivost spermija. Kap zagrijane fiziološke otopine stavlja se na preparat (u kap svježeg ejakulata) i pomiješa ga se ravnomjerno. Dobivena mješavina omogućava promatranje kretanja pojedinih spermija. Ako je mješavina sjemeni previše koncentrirana da bi se razaznali pojedinačni spermiji, treba napraviti novu pripremu s manjom količinom ejakulata. S iskustvom, procjenitelj će moći odrediti količinu ejakulata koju treba staviti na premetno stakalce kako bi se napravio odgovarajući preparat (EDMONDSON i sur., 2012.).

Ispitivač bi trebao vizualno procijeniti postotak progresivno gibljivih spermija. Masivna pokretljivost spermija procjenjuje se pod malim povećanjem. Iako se koncentracija rutinski ne procjenjuje u uvjetima terenskog rada, preporučuje se uključiti ovu procjenu u evaluaciju. Koncentracija se lako može procijeniti pomoću hemocitometra i komercijalnog Unopette sustava za brojanje bijelih krvnih stanica. Ispitivač također treba zabilježiti broj okruglih stanica prisutnih na svakom preparatu. Ako se u svakom polju srednjeg uvećanja vidi više od dvije okrugle stanice, treba napraviti razmaz sjemeni za citološku procjenu (npr. pomoću Wrightove boje). Prisutnost leukocita ukazuje na upalu ili infekciju. Prisutnost ranih

nukleiranih okruglih spolnih stanica ukazuje na poremećaj spermatogeneze. Jarčevi trebaju imati više od 70 % progresivno gibljivih spermija. Gibljivost je obično smanjena izvan sezone parenja (EDMONDSON i sur., 2012., SANCHEZ-DAVILA i sur., 2020.).

Morfologija spermija se procjenjuje pomoću preparat koji se izrađuje tako što se mala kap ejakulata pomješa s kapljom eosin-nigrosin boje na predmetnom stakalcu te se izradi razmaz pomoću drugog premetnog stakalca glatkih rubova. Dobiveni razmaz trebao bi imati ravnomjernu distribuciju stanica. Spermiji trebaju biti raspoređeni tako da se pojedinačne stanice lako razaznaju, ali u svakom vidnom polju treba biti otprilike 10 stanica. Preparat se ostavi da se osuši, a zatim se pregledava pod povećanjem $1000\times$ s objektivom za uranjanje u imerzijsko ulje. Ispitivač treba prebrojati najmanje 100 stanica i odrediti postotak spermija normalne morfologije (EDMONDSON i sur., 2012.).

Patološki oblici spermija se bilježe kao primarni ili sekundarni. Primarni patološki oblici uključuju glavu i središnji dio spermija, dok sekundarni patološki oblici uključuju promjene na repu. Vrsta patoloških oblika spermija može se koristiti za procjenu ozbiljnosti problema u mužjaka s prekomjernim brojem patoloških stanica. Patološki oblici glave i akrosoma povezane su s ozbiljnim testikularnim poremećajima. Patološki oblici repa često su povezane s manje ozbiljnim problemima ili bolestima epididimisa. Okrugle kapi citoplazme (protoplazmatske kapljice) na repu spermija obično se viđaju kod mladih ovnova i povezane su s prekomjernom uporabom, nezrelošću ili blagim testikularnim degeneracijama. Protoplazmatske kapljice također mogu nastati u uzorcima uzetim od mužjaka izvan sezone parenja. Rasplodni jarac mora imati u ejakulatu najmanje 70 % morfološki normalnih spermija. Jarca koji ne zadovoljava procjenu ejakulata može se ponovno procijeniti nakon 8 tjedana ili ga treba ukloniti iz uzgoja. Jarci koji pokazuju smanjen libido, blago smanjen opseg skrotuma i povećani udio patoloških oblika spermija trebaju biti identificirani i uklonjeni ga iz uzgoja (EDMONDSON i sur., 2012., LEDEZMA-TORRES i sur., 2022.).

Najčešće procijenjeni pokazatelji kakvoće sjemena širom svijeta je gibljivost. Dugi niz godina standardna metoda u laboratorijima bila je subjektivna mikroskopska procjena (MALLIDIS i sur., 2012.). Svjetska zdravstvena organizacija preporučuje subjektivnu procjenu od strane obučanih androloga kao zlatni standard u evaluaciji ljudskog sjemena (WHO, 2010.). Iako je ova tehnika prihvaćena globalno, ona uvelike ovisi o obuci i testiranju laboratorijske stručnosti, što je čini značajno ovisnom o procjenitelju.

Kako bi se prevladao ovaj problem, pojavile su se objektivne tehnologije poput sustava za računalno potpomognutu analizu spermija (CASA), koji se koriste u svakodnevnoj rutini obrade sjemena. CASA je sustav koji kombinira specifičan hardver i softver, kameru visoke

rezolucije i mikroskop, omogućujući računalno potpomognutu procjenu koncentracije, pokretljivosti, brzine i morfologije sjemeni pomoću prepoznavanja gustoće i piksela (AMANN i WABERSKI, 2014., FINELLI i sur., 2021.).

Međutim, čak i s računalnim sustavima, mnoge su studije otkrile varijacije među operatorima, uređajima iste marke te između različitih modela (VERSTEGEN i sur., 2002., HANSEN i sur., 2006., BRITO, 2010., O'MEARA i sur., 2022.).

Pomoću CASA sustava moguće je procijeniti ukupnu gibljivost spermija (%), progresivnu gibljivost (%) i manevrirajuće gibanje (%), kao i razne pokazatelje brzine spermija:

Krivolinijska brzina (engl. VCL - curvilinear velocity) odnosi se na prosječnu brzinu spermija duž njegove krivolinijske putanje; izražava se u $\mu\text{m/s}$.

Pravolinijska brzina (engl. VSL - straight-line velocity) definira prosječnu brzinu spermija na pravolinijskoj putanji, tj. putanji koja povezuje prvu i posljednju zabilježenu poziciju spermija; izražava se u $\mu\text{m/s}$.

Prosječna brzina (engl. VAP - average path velocity) predstavlja prosječnu brzinu spermija duž njegove prosječne putanje, koja se izračunava pomoću CASA algoritma radi korekcije krivolinijskog gibanja spermija; izražava se u $\mu\text{m/s}$.

Amplituda lateralnog otklona glave u odnosu na prosječnu putanju (engl. ALH - amplitude of lateral head displacement) predstavlja lateralni pomak glave spermija; izražava se u $\mu\text{m/s}$.

Indeks linearnosti (engl. LIN – linearity) definira linearnost krivolinijske putanje spermija i izračunava se omjerom pravolinijske brzine i krivolinijske brzine (VSL/VCL); izražen je u %.

Indeks oscilacije (engl. WOB – wobble) predstavlja stupanj oscilacije prave putanje u odnosu na prosječnu putanju spermija te se izračunava omjerom prosječne brzine i krivolinijske brzine (VAP/VCL); izražen je u %.

Pravolinijski indeks (engl. STR – straightness) pokazuje linearnost kretanja na prosječnoj putanji spermija i izračunava se omjerom pravolinijske brzine i prosječne brzine (VSL/VAP); izražen je u %.

Frekvencija prelaska pravolinijske putanje (engl. BCF – beat cross frequency) označava prosječan broj prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje u sekundi; izražena je u Hz.

Prednosti CASA sustava uključuju detaljnu analizu pokazatelja gibljivosti, kinetičkih analiza, hiperaktivacije i morfometrije spermija. Klinička važnost CASA pokazatelja leži u

procjeni reproduktivnog potencijala spermija. CASA mjerenja pokazala su se izuzetno korisnima u praćenju suptilnih promjena u distribuciji gibljivosti i brzine spermija kao odgovora na različite fiziološke i okolišne uvjete (AYAD, 2008.).

Od svih spomenutih pokazatelja, VCL, ALH i BCF su najvažniji za procjenu kvalitete spermija nerasta (GIL i sur., 2009.). ALH je ključni pokazatelj gibljivosti jer je određena razina gibljivosti potrebna za penetraciju cervikalne barijere krmače. Prema BROEKHUIJSE i sur. (2011.), VAP je također važan parametar za procjenu kakvoće sjemena korištenog u umjetnom osjemenjivanju krmača (BUTKOVIĆ, 2021.).

2.3. MORFOLOŠKE I FUNKCIONALNE OSOBITOSTI REPA SPERMIJA IZMEĐU RAZLIČITIH VRSTA SISAVACA

Morfološke osobine spermija, uključujući oblik glave i duljinu repa, variraju među sisavcima. Širina i duljina glave spermija uglavnom se razlikuju zbog varijacija u veličini i organizaciji akrosoma i jezgre (MORTIMER, 2018.). Rep spermija može se podijeliti na četiri različita segmenta: vezni dio (poznat i kao vrat), srednji dio (mid-piece), glavni dio i završni dio (CUMMINS i WOODALL, 1985.).

Vezni dio, najbliži glavi spermija, sadrži degenerirane centriole, koje u usporedbi sa centriolima somatskih stanica imaju ograničene strukturne značajke i proteinski sastav (AVIDOR-REISS i sur., 2015.), te prijelazne strukture koje se povezuju s unutarnjim strukturama u srednjem dijelu (WOOLLEY i sur., 2008.). Srednji dio definiran je citoskeletnim strukturama okruženim gusto raspoređenim mitohondrijima (LINDEMANN i LESICH, 2016.).

Glavni dio repa karakterizira fibrozna ovojnica koja obavija citoskelet (EDDY i sur., 2003.). Završni dio repa predstavlja produžetak glavnog dijela, ali bez ikakvih pomoćnih struktura (INABA, 2011.). Duljine povezanog i završnog dijela obično su kratke među vrstama, dok duljine središnjeg i glavnog dijela pridonose varijacijama u duljini repa među sisavcima (GAGE, 1998.).

Mitohondriji u središnjem dijelu spermija glavni su izvor adenozin-trifosfata (ATP). Oni proizvode i transportiraju energiju do aksonema u glavnom dijelu repa, koji generira pokretačku snagu spermija (PIOMBONI i sur., 2012.). Stoga, duljina središnjeg i glavnog

dijela repa može biti ključna za brzinu gibanja spermija i njihovu uspješnost u oplodnji (LÜPOLD i sur., 2009., MOSSMAN i sur., 2009., FIRMAN i SIMMONS, 2010., BENNISON i sur., 2015., GU i sur., 2019.).

Osim značajnih varijacija u obliku glave i duljini repa, morfologija unutarnjih ultrastruktura, uključujući mitohondrijsku ovojnica, vanjska gusta vlakna i fibroznu ovojnica, znatno se razlikuje među vrstama sisavaca (FAWCETT, 1970., SERRES i sur., 1983.). Međutim, aksonema pokazuje vrlo malo varijacija među vrstama. Aksonema ima očuvani raspored mikrotubula u obliku 9+2 u poprečnom presjeku, gdje je devet dvostrukih mikrotubula povezano s centralnim parom, koji se sastoji od dva pojedinačna mikrotubula. Koordinirane aktivnosti više dyneinskih motora potiču hidrolizu ATP-a u aksonemi, što omogućuje pokretljivost flageluma (LIN i NICASTRO, 2018.). Tradicionalno se smatra da je širina aksoneme konstantna od baze do vrha repa spermija, čak i među različitim vrstama (O'DONNELL i O'BRYAN, 2014., GU i sur., 2019.).

Mitohondrijska ovojnica obuhvaća područje središnjeg dijela i okružuje vanjska gusta vlakna i aksonemu. Mitohondrijska ovojnica se sastoji od različitog broja mitohondrija koje su izdužene i raspoređene u obliku zavojnice (heliks), poznatom kao gyres, koji se razlikuje od vrste do vrste. Na primjer, procjenjuje se da u ljudi postoji 10-12 gyresa, u pasa 15-17, u miševa 97, a u štakoria 350 (FAWCETT, 1970.). Obično, se vanjska gusta vlakna sastoje od seta od devet prugastih stupova koji počinju u povezanoj jedinici i završavaju na specifičnom položaju repa kod određenih vrsta. U uzdužnom prikazu, svako je vlakno najveće na proksimalnom kraju središnjeg dijela i postupno se sužava duž repa, s različitim završecima na različitim pozicijama duž glavnog dijela (IRONS i CLERMONT, 1982.). U poprečnom presjeku, oblik i veličina svakog vlakna razlikuju se između i unutar vrsta (OLSON i SAMMONS, 1980.). Smatra se da vanjska gusta vlakna ne samo da štite rep od oštećenja uzrokovanih prolaskom kroz epididimis i tijekom ejakulacije, već i povećavaju čvrstoću repa te stabiliziraju aksonemu (BALTZ i sur., 1990., ZHAO i sur., 2018.).

Fibrozna ovojnica je citoskeletna struktura glavnog dijela. Sastoji se od dva longitudinalna stupa povezana polukružnim rebrima. Veličina longitudinalnih stupova najveća je u prednjem dijelu glavnog dijela i postepeno opada duž glavnog dijela (FUJITA i sur., 2000.). U poprečnom presjeku, oblik i veličina uzdužnih stupova, ali ne i polukružnih rebara, pokazuju veliku varijaciju među vrstama sisavaca. Fibrozna ovojnica služi kao kostur za

proteine koji sudjeluju u glikolizi, signalnoj transdukciji posredovanoj cikličkim adenozin monofosfatom i mehaničkoj potpori (MIKI i sur., 2004., EDDY, 2007., GU i sur., 2019.).

Iako su strukture repa spermija okarakterizirane kod mnogih vrsta, ograničeni su podaci o trodimenzionalnoj prirodi ovih unutarnjih struktura između različitih vrsta, kao i unutar iste vrste. Nadalje, odnosi između trodimenzionalnih unutarnjih ultrastruktura i morfologije spermija, brzine gibanja i funkcije mitohondrija slabo su istraženi (GU i sur., 2019.).

Zajedničke karakteristike za deset proučavanih vrsta (zamorčica, miša, štakora, zlatnog hrčka, psa, bika, svinju, zeca, kozu i čovjeka) su da rep i unutarnje ultrastrukture, uključujući mitohondrijsku ovojnicu, ukupna vanjska gusta vlakna, pojedinačno vanjsko gusto vlakno, fibroznu ovojnicu i aksonemu je da se postupno sužavaju od vrha prema kraju, a nagibi ovih struktura i oblici glava spermija pokazuju vrsno specifične osobitosti. Dodatno, strukturni opis pruža nova saznanja o pozitivnim povezivanjima među unutarnjim strukturama, posebno vanjskim fibroznim ovonicama i mitohondrijama, i duljinom repa, otkrivajući odnose između struktura i fiziologije spermija. Proteini uključeni u strukturu ovojnice mitohondrija i vanjskih gustih vlakana mogu određivati duljinu repa, što se smatra ključnim čimbenikom u istraživanjima motoričkih sposobnosti spermija i kompeticije spermija (GU i sur., 2019.).

2.3. NAVIGACIJA SPERMIJA: BIOMEHANIČKI I HIDRODINAMIČKI IZAZOVI OPLODNJE

2.3.1. MEHANIZMI NAVIGACIJE SPERMIJA I IZAZOVI NA PUTU DO OPLODNJE

Za uspješnu oplodnju, jajna stanica i spermij moraju se susresti, a tijekom tog putovanja spermiji izvode impresivne navigacijske manevre. Gibanje spermija prema jajnoj stanici omogućuje udaranje repa (flagelum). U sisavaca i beskralješnjaka, spermiji koriste različite osjetne mehanizme za prikupljanje fizičkih ili kemijskih signala potrebnih za lociranje jajne stanice.

U sisavaca su poznata tri glavna mehanizma pomoću kojih spermiji prolaze kroz uski jajovod: kemotaksija (EISENBACH i GIOJALAS, 2006., KAUPP i sur., 2008.), termotaksija (BAHAT i sur., 2003.) i reotaksija (BRETHERTON i ROTHCHILD, 1961., MIKI i CLAPHAM, 2013.). Međutim, ovi mehanizmi, kao i njihov doprinos navigaciji spermija, još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Razlog tome može biti nemogućnost simulacije složenih prirodnih uvjeta s kojima se spermiji susreću tijekom oplodnje. Tijekom prolaska kroz ženski

spolni sustav, spermiji sisavaca prolaze kroz kapacitaciju i hiperaktivaciju kako bi stekli sposobnost oplodnje jajnih stanica (EISENBACH i GIOJALAS, 2006., SUAREZ, 2008.). U svakom trenutku samo dio populacije spermija je kapacitiran ili hiperaktivan, što čini ove populacije heterogenima. Osim toga, spermiji su prostorno ograničeni anizotropnim ženskim spolnim sustavom te dolaze u interakciju s trepetljivim epitelom jajovoda (ALVAREZ i sur., 2014.).

2.3.2. HIDRODINAMIKA I OBRASCI GIBANJA SPERMIJA

Gibanje spermija, bakterija i algi određeno je hidrodinamikom tekućine u kojoj se nalaze i prostornim ograničenjima. Kod unutarnje oplodnje, spermiji sisavaca gibaju se duž uskog jajovoda te stupaju u interakciju s epitelom ženskog spolnog sustava. Kod nekih "emitirajućih oploditelja", poput riba, spermiji se gibaju po površini velikog jajašca dok traže mali ulaz na mjesto oplodnje, poznat kao mikropila (YANAGIMACHI i sur., 2013.). Stoga je interakcija spermija s stjenkama ključna za proces oplodnje (ALVAREZ i sur., 2014.).

Iz hidrodinamičke perspektive, spermiji se klasificiraju kao „gurači“; to su skupina spermija s motorom na stražnjem dijelu (rep) i pasivnim opterećenjem na prednjem dijelu (glava) (ISHIKAWA, 2009., LAUGA i POWERS, 2009.). Polje protoka oko „gurača“ karakterizira povratni protok straga (uzrokovano repom koji tekućinu gura unatrag) i naprijed usmjeren protok ispred glave (koja vuče tekućinu za sobom). Tekućina koja se izbacuje mora se nadoknaditi protokom sa strane. Kada se „gurač“ približi stjenci, polje protoka se iskrivljuje. Ograničeno uvlačenje tekućine sa strane stjenke uzrokuje da se većina tekućine nadoknađuje s druge strane, što gura stanicu prema stjenci. Kada se spermiji približe stjenci, stupaju na snagu dodatne interakcije, pri čemu aproksimacija dalekog polja postaje nepouzdana. Numeričke simulacije temeljene na mezoskalnoj hidrodinamici pokazuju da spermiji bivaju privučeni stjenci, dok se ravnina udaranja repa poravnava sa stjenkom (ELGETI i sur., 2010.). Međutim, paralelno poravnanje nije savršeno; spermiji se gibaju s blago nagnutom osi, što gura glavu prema stjenci i dodatno stabilizira njihovu poziciju (ELGETI i GOMPPER, 2009.). U mikrokanalima, spermiji se gibaju uz stjenku ili protiv nje (WOOLLEY, 2003., DENISSENKO i sur., 2012.), što je u skladu s mezoskalnim simulacijama (ELGETI i sur., 2010.), ali nije u skladu s predviđanjima drugih računalnih modela koji predviđaju isključivo plivanje blizu stjenke (SMITH i sur., 2009., ALVAREZ i sur., 2014.).

2.4. MORFOMETRIJSKA ANALIZA I POVEZANOST MORFOLOGIJE SPERMIJA S PLODNOŠĆU RASPLODNJAKA

Odgovarajuća procjena plodnosti rasplodnjaka od najvećeg je značaja za genetski napredak u uzgoju jer se loš odabir rasplodnjaka nosioca nasljednih mliječnih svojstava može odraziti odnosno narušiti planiranje proizvodnje stoke na dulje uzgojno razdoblje. Način procjene plodnosti rasplodnjaka temelji se na procjeni kakvoće sperme, koja je ključna za izračunavanje doza sperme potrebnih za umjetno osjemenjivanje većine domaćih životinja (VALVERDE i sur., 2016., RIBAS-MAYNOU i sur., 2023.). Subjektivni postupci u procjeni sjemena rasplodnjaka u centrima za umjetno osjemenjivanje sve se više zamjenjuju automatiziranim uređajima kako bi se smanjila subjektivnost, omogućila ponovljivost i povećala preciznost procjene spermija (MAROTO-MORALES i sur., 2016., FINELLI i sur., 2021.). Tako se primjerice, uporabom standardnih postupaka u procjeni morfologije spermija rasplodnjaka ne može temeljito procijeniti male, ali značajne razlike koje postoje između spermija u različitim uzorcima sjemena. Potreba za točnom odnosno objektivnom procjenom morfologije spermija dovela je do razvoja računalno potpomognute analize morfologije spermija, koja omogućuje brzu procjenu velikog broja spermija. Osim toga, primjenom računalno potpomognute analize morfologije spermija i multivarijantnih statističkih metoda, uključujući diskriminacijske i klaster analize, moguće je utvrditi prisustvo diskretnih subpopulacija spermija s različitim morfometrijskim karakteristikama u ejakulatima sisavaca (PEÑA i sur., 2005., RUBIO-GUILLÉN i sur., 2007., QUINTERO-MORENO i sur., 2007., VALVERDE i sur., 2016., ŽURA ŽAJA i sur., 2018., ŽURA ŽAJA i sur., 2024.).

Morfometrija spermija definirana je kao metoda mjerenja dimenzija spermija (površina glave, površina i duljina središnjeg dijela, duljina repa i sveukupna duljina spermija (μm)). U evolucijskoj se biologiji još uvijek raspravlja koja je od dvije komponente spermija značajnija u kompeticiji spermija tijekom procesa oplodnje jajne stanice. Naime, povećanje središnjeg djela spermija povećava njegovu energiju uslijed povećanja područja u kojem su smješteni mitohondriji (GOMENDIO i ROLDAN, 2008.). Nadalje, smatra se da će povećanje duljine repa spermija povećati njegovu brzinu gibanja, stoga se može pretpostaviti da će se povećati i postotak njegove gibljivosti. Obje komponente su značajne u brzini spermija odnosno njegovog pravovremenog dolaska na mjesto oplodnje unutar ženskog spolnog sustava. Dulji rep će povećati brzinu gibanja spermija. S druge pak strane, energija spermija se stvara u mitohondrijima koji su smješteni unutar središnjeg djela. Više je energije potrebno za brže spermije. Pozitivna korelacija između duljeg repa i središnjeg djela spermija može pozitivno utjecati na dugovječnost spermija. FIRMAN i SIMMONS (2010.) navode da je

veličina središnjeg dijela prediktor brzine gibanja spermija *Mus musculus domesticus*. Različite rezultate su ustvrdili MALO i sur. (2006.) koji su pronašli negativnu korelaciju između duljine središnjeg dijela i brzine gibanja spermija u jelena (*Cervus elaphus*). Rezultati su pokazali da postoji pozitivna korelacija između duljine središnjeg dijela i duljine repa s kompeticijom spermija u Fringillidae, stoga je pozitivan odnos između veličine spermija i kompeticije spermija pronađen u Sylviidae (WIBOWOA i sur., 2013.). Empirijski je dokazano na različitim vrstama da je funkcija spermija povezana s njegovom morfometrijom, što uključujući površinu glave, središnjeg dijela i repa (IMMLER i sur. 2010., SHAHANI i sur., 2010.). U bikova se uporaba morfometrijskih pokazatelja glave spermija smatra dobrim pokazateljem kakvoće sjemena, te se preporučuje kao sastavni dio spermiograma domaćih životinja (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2007., SOUSA i sur., 2013.).

Iako se već neko vrijeme uspješno koriste multivarijantne analize temeljene na analizi glavnih komponenti, diskriminacijskoj analizi i analizi grupiranja morfometrijskih pokazatelja kako bi se proučile dobivene subpopulacije spermija temeljene na morfometrijskim pokazateljima glave u više životinjskih vrsta (THURSTON i sur., 2001., BUENDÍA i sur., 2002., ESTESO i sur., 2006., RUBIO-GUILLÉN i sur., 2007., ŽURA ŽAJA i sur., 2018., ŽURA ŽAJA i sur., 2024.), subpopulacija spermija jarčeva obzirom na cjelokupne morfometrijske pokazatelje kao što su mjere glave, središnjeg dijela i repa nisu dobivene. Jedna od glavnih funkcija morfologije spermija je zaštita i prijenos očinskog haploidnog genoma u oocitu. Genetska informacija nalazi se unutar glave spermija i obuhvaća oko 65 % ukupnog volumena njegove glave (SINHA i sur., 2014.). Prethodna su istraživanja ustvrdila da je smanjenje površine glave spermija povezano s smanjenom plodnošću (BARTH i sur., 1992.). Nepravilna morfologija spermija važan je pokazatelj smanjene plodnosti u muškaraca (KRUGER i sur., 1993.), pastuha (LOVE, 2011.) i bikova (NAGY i sur., 2013.). Patološki oblici glave spermija povezane su s ranim gubitkom embrija, smanjenom plodnošću i kakvoćom embrija (DE JARNETTE i sur., 1992.) te smanjenom sposobnošću vezanja na jajnu stanicu (KOT i HANDEL, 1987.). Iako normalna morfologija spermija može biti pokazatelj oplodnog potencijala određenog mužjaka, do sada su se korelacije temeljile na subjektivnoj analizi. Međutim, poznato je da postoje velike varijacije između tehničara i laboratorija u subjektivnoj procjeni svojstava spermija, što otežava točnu interpretaciju dobivenih podataka. Uslijed toga implementirani su suvremeni pristupi pomoću računalno potpomognute analize slike kojima se rješava subjektivnost, poboljšava ponovljivost i povećava osjetljivost. Objektivna je procjena spermija vrlo značajna kako bi se osigurali kvalitetni spermiji koji se koriste za umjetno osjemenjivanje (SINHA i sur., 2014.). Ponekad

je potrebno razmotriti i druge aspekte fiziologije i morfologije spermija, koji mogu utjecati na njihovu sposobnost aktivnog gibanja kroz ženski spolni sustav. U mnogih je vrsta, prva prepreka cervikalna sluz, koja dopušta prolazak u maternicu samo progresivno gibljive spermije s normalnom morfologijom i kroz koju se progresivno gibaju (uz pomoć kontrakcija miometrija) do jajovoda, gdje će doći do oplodnje (DRUART, 2012.).

U pokušajima oponašanja prethodno navedenog procesa *in vivo* selekcije, različite metode odabira spermija rutinski se koriste u *in vitro* protokolima, kao što je *in vitro* oplodnja ili izdvajanje spermija, kako bi se uzorak obogatio morfološki normalnim i gibljivim spermijima (MORTOM i sur., 2006.). Tijekom tog procesa odabrani su ne samo morfološki normalni i progresivno gibljivi spermiji, nego se *in vitro* muške zametne stanice podvrgavaju i fiziološkim promjenama, nazvanim kapacitacijom, a koja je temeljni preduvjet za stjecanje funkcionalne sposobnosti spermija da budu podvrgnuti akrosomskoj reakciji i oplode oocitu. Međutim, još nije u potpunosti poznato kako ti procesi utječu na morfologiju spermija, odnosno još važnije, nisu poznate morfometrijske karakteristike stanica koje na kraju oplođuju oocite (SKOWRONEK i sur., 2024.). Nedavno GARCÍA-VÁZQUEZ i sur. (2015.) navode kako se spermiji nerasta u ženskom spolnom sustavu odabiru na temelju njihove veličine i oblika, te da oni s većom glavom i duljim repom dolaze do mjesta oplodnje. Za morfometrijske promjene spermija tijekom kapacitacije, GARCÍA-HERREROS i LEAL, (2015.) navode da je indukcija *in vitro* kapacitacije u spermijima bika uzrokovala promjenu morfometrije glave spermija. Kako su spermiji koji su bili podvrgnuti kapacitaciji pokazivali smanjenje svih pokazatelja veličine i oblika glave spermija, autori su zaključili da je morfometrija glave spermija objektivni dijagnostički alat za procjenu spermija tijekom kapacitacije.

Tijekom gibanja spermija kroz ženski spolni sustav prema mjestu oplodnje, gibljivost spermija je ključna. Nekoliko studija navodi da morfologija spermija i brzina spermija mogu biti povezane, (MALO i sur., 2006., RAMON i sur., 2013., ROS-SANTAELLA i sur., 2014.), te da morfologija i brzina gibanja spermija utječu na oplodnu sposobnost (MALO i sur., 2005.). Međutim, rezultati su kontradiktorni o tome kako se raznolikost spermija odražava na varijacije u brzini spermija (MALO i sur., 2006., MAROTO-MORALES i sur., 2016.). Samo se nekoliko istraživanja provelo na istoj vrsti kako bi se izravno proučavale morfologija i gibljivost spermija. RAMON i sur. (2013.) navode da ejakulati jelena koji sadrže velik postotak spermija s brzom i linearnom gibljivošću imaju male i izdužene glave i dosežu veću plodnost. Izduljena glava spermija može imati važnu funkciju tako što će takav spermij biti hidrodinamički učinkovitiji zbog manjeg otpora u gibanju prema naprijed, a što može utjecati na oplodnu sposobnost spermija (MALO i sur., 2005., YÁÑIZ i sur., 2015.). Budući da je

većina glave spermija ispunjena jezgrom, njezina kompaktnost može utjecati na oblik glave spermija. Varijacije u morfometriji glave spermija povezane su s patološkom strukturom kromatina u spermijima bika (OSTERMEIER i sur., 2001., VALVERDE i sur., 2016.). Navode se kontradiktorni podaci o funkciji morfometrije i oplodnih svojstava spermija zbog toga se preporuča riješiti ova pitanja koristeći sofisticiranije tehnike koje definiraju koji su morfometrijski pokazatelji spermija ključni za uspjeh u uzgoju životinja (MAROTO-MORALES i sur., 2016.). Normalna morfologija spermija je glavni kriterij u procjeni kakvoće spermija. Međutim, iako postoje podaci o povezanosti između morfometrijskih karakteristika i plodnosti spermija, rezultati se uvelike razlikuju i ponekad su oprečni. Osim toga, više pozornosti treba usmjeriti na druge strukture spermija izuzev glave. Primjena znanstvenih i tehnoloških dostignuća mogla bi imati značaja u istovremenom određivanju fenotipa sperme i funkcije sperme. Takva bi tehnologija trebala kombinirati programe optičke i slikovne analize visoke rezolucije kako bi se povećala točnost i preciznost laboratorijskih ispitivanja, sa najsuvremenijim statističkim metodama koje omogućuju analizu velikih količina podataka dobivenih suvremenom tehnologijom (MAROTO-MORALES i sur., 2016.).

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Ejakulat domaćih životinja heterogene je prirode, sastavljeno od subpopulacija spermija koje se razlikuju po morfološkim, fiziološkim, kinetičkim i funkcionalnim svojstvima. Razlike u građi glave, središnjeg dijela i repa spermija, kao i udio pojedinih subpopulacija u ejakulatu, povezane su sa smanjenom plodnošću mužjaka, ranom embrionalnom smrtnosti i učinkovitosti skladištenja sjemenja. Premda se morfometrijska obilježja spermija intenzivno istražuju kod mnogih domaćih životinja, podaci o povezanosti morfometrijskih karakteristika

smrznutih/odmrznutih spermija jarčeva i njihovih subpopulacija s pokazateljima kakvoće sjemena još uvijek nisu dostupni.

Procjena kakvoće sjemena ključna je za uspješnost umjetnog osjemenjivanja, osobito u uzgoju jarčeva gdje je cilj osigurati optimalnu proizvodnju potomstva. Postizanje visoke plodnosti mužjaka ovisi o razumijevanju morfometrijskih svojstava spermija, poput površine i oblika glave, duljine središnjeg dijela i repa te njihovih međusobnih odnosa. S obzirom na to da su navedena svojstva usko povezana s funkcionalnim sposobnostima spermija, istraživanje ovih karakteristika može omogućiti razvoj pouzdanih metoda za procjenu plodnosti i kakvoće sjemena.

Cilj ovog istraživanja jest bila identificirati i kvantificirati morfometrijske pokazatelje smrznutih/odmrznutih spermija jarčeva te uz primjenu naprednih statističkih metoda definirati njihove subpopulacije. Nadalje, namjera je bila utvrditi postoji li povezanost između subpopulacija spermija i ključnih kinetičkih pokazatelja kakvoće sjemena.

Očekivani rezultati ovog istraživanja pružit će temelj za izradu standardiziranih protokola za procjenu kakvoće odmrznutoga sjemena jarčeva, čime bi se značajno unaprijedila učinkovitost postupaka umjetnog osjemenjivanja. Također, rezultati bi mogli doprinijeti poboljšanju uzgojnih programa kroz povećanje plodnosti i proizvodne učinkovitosti mužjaka, čime bi se osigurala veća ekonomska isplativost u proizvodnji jarčeva.

Temeljitom analizom povezanosti morfometrijskih obilježja spermija i njihovih funkcionalnih svojstava, ovo istraživanje ima potencijal unaprijediti postojeće metode procjene plodnosti rasplodnjaka, osiguravajući tako bolje razumijevanje fiziologije spermija i njihova utjecaja na reproduktivni uspjeh.

Hipoteza istraživanja

Pretpostavka istraživanja je da postoji povezanost između morfometrijskih pokazatelja spermija (površina, duljina i širina glave i središnjeg dijela spermija, duljina repa i spermija, pravilnost, naboranost, eliptičnost i elongacija glave spermija) s kinetičkim pokazateljima odmrznutoga sjemena jarčeva. Očekuje se i povezanost dobivenih subpopulacija spermija s pojedinim kinetičkim pokazateljima kakvoće odmrznutoga sjemena.

Opći cilj

Cilj je ovog istraživanja istražiti povezanost morfometrijskih svojstava spermija jarčeva s kinetičkim pokazateljima kakvoće odmrznutoga sjemena.

Specifični ciljevi:

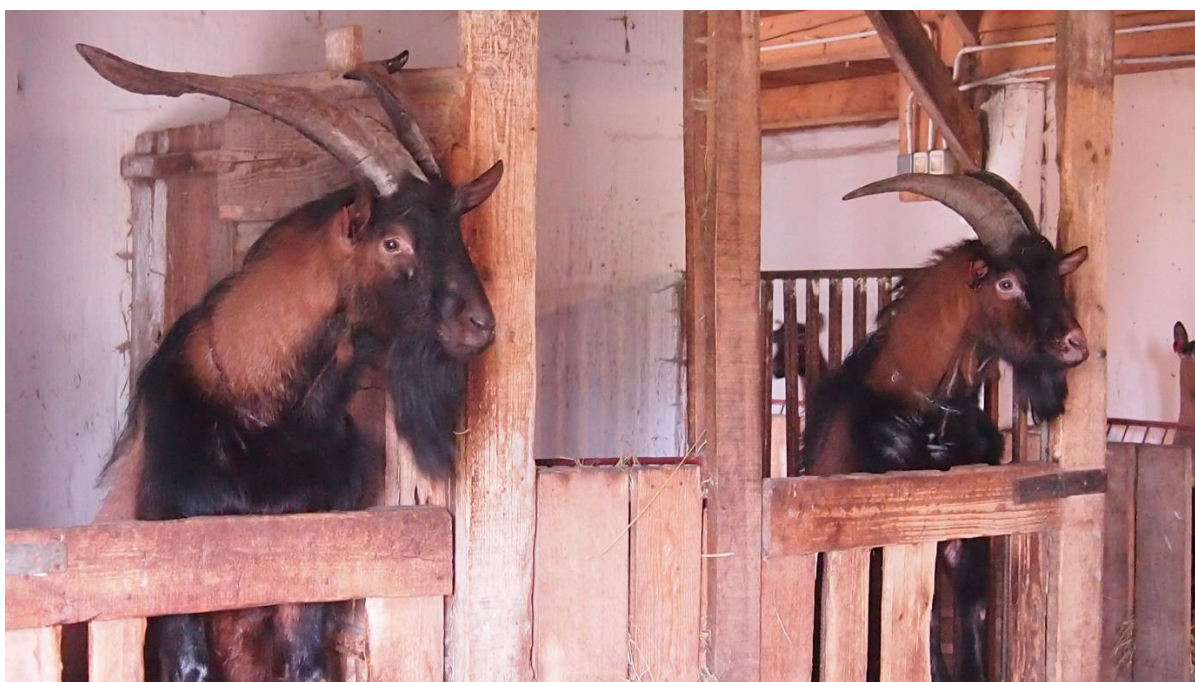
- odrediti morfometrijske pokazatelje odmrznutih spermija jarčeva
- odrediti kinetičke pokazatelje kakvoće odmrznutoga sjemena
- suvremenim statističkim metodama odrediti subpopulacije spermija temeljem morfometrijskih pokazatelja spermija i pokazatelja brzine gibanja spermija
- istražiti međusobnu povezanost prethodno navedenih pokazatelja.

4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

Provođenje ovog istraživanja odobrilo je Fakultetsko vijeće Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na prijedlog Povjerenstva za etiku u veterinarstvu (23. siječnja 2019.; klasa: 640-01/19-17/02; ur.broj: 251-61-44-19-02.

4.1. ŽIVOTINJE, SMJEŠTAJ I HRANIDBA

U istraživanju je sudjelovalo 12 klinički zdravih jarčeva pasmine francuska alpina, starosti od 1,5 do 4 godine, tjelesne mase između 40 i 60 kg. Jarčevi su bili smješteni na tri obiteljske farme, po četiri jarca na svakoj farmi, na području Veterinarske stanice d.d. Varaždin, područne ambulante Jalžabet. Sve farme nalazile su se unutar 5 km jedna od druge, a svaka je imala oko 60 koza iste pasmine, koje su bile smještene odvojeno od jarčeva (Slika 4.1.).



Slika 4.1. Jarčevi držani zasebno od koza (fotografirao dr. sc. Velimir Berta, dr. vet. med.).

Životinje su bile držane u istim bioklimatskim uvjetima, s prirodnim osvjetljenjem i podovima prekrivenim slamom. Jarčevi su bili u dobrom reproduktivnom stanju, s prosječnom koncepcijom koza od $92,5 \pm 10,6$ % u prethodnoj sezoni parenja i prosječnim brojem jaradi od $1,5 \pm 0,2$ po kozi.

Hranidba jarčeva na farmama bila je jednaka, jer su sve farme funkcionirale kao obiteljska gospodarstva za uzgoj mliječnih koza. Jarčevi su svakodnevno dobivali livadno

sijeno i oko 1 kg smjese, koja je sadržavala 25 % kukuruza, 20 % ječma, 15 % pšenice, 15 % zobi, te 23 % komercijalne krmne smjese „KzO-Do“ i 2 % smjese „Ko-vi dar“ bogate vitaminima i mineralima. Imali su neograničen pristup mineralnim blokovima (sol) i vodi. Pola dnevne porcije hrane dobivali su otprilike 1,5 sat prije uzimanja ejakulata, a ostatak 12 sati kasnije.

Tablica 1. Sastav smjese za ishranu jarčeva.

Dopunska krmna smjesa "KzO-Do"		Dopunska krmna smjesa "Ko-vi dar"	
sirove bjelančevine	30 %	kalcij	29,9 %
		fosfor	3 %
		natrij	2 %
sirova vlakna	20,9 %	magnezij	2 %
		bakar	8,32 mg
		cink	113 mg
sirova mast	1,7 %	jod	1,15 mg
		željezo	75 mg
		magnezij	75 mg
pepeo	10,9 %	selen	0,23 mg
		vitamin A	28800 IJ
		vitamin D	2950 IJ
natrij	0,7 %	vitamin E	29 mg
		niacin	150 mg
		metionin	800 mg
		antioksidansi	11300 mg
Sastojci navedeni u 1 kilogramu dopunske krmne smjese			

4.2. DIZAJN POKUSA I POSTUPCI SA ŽIVOTINJAMA

Istraživanje se provodilo izvan rasplodne sezone, od početka ožujka do kraja svibnja 2016. godine, u trajanju od 12 tjedana. Početkom sezone parenja (rujan i listopad 2015. godine), te neposredno prije početka istraživanja, jarčevima je više puta uziman ejakulat umjetnom vaginom kako bi se navikli na postupak i osobu koja ga provodi.

Tijekom istraživanja, jarčevima se jednom tjedno u jutarnjim satima uzimao ejakulat. Ukupno je za potrebe istraživanja nasumično odabrano 30 ejakulata. Za polučivanje ejakulata na svakoj farmi estrus je induciran kod dvije koze koje su služile kao fantom. Koristio se

standardni protokol sinkronizacije estrusa: intravaginalna aplikacija spužvice s progestagenom (40 mg; Fluorogestone acetate-FGA, Chronogest®, Intervet, Francuska) u trajanju od 11 dana, intramuskularna aplikacija prostaglandina (PGF 2α) (75 μ g; Estrumate®, Shering-Plough, Francuska) i konjskog korionskog gonadotropina (eCG) (400 IJ; Folligon®, Intervet, Nizozemska) 48 sati prije vađenja spužvice. Estrus je detektiran 24 do 30 sati nakon vađenja spužvice.

4.3. POLUČIVANJE I POSTUPAK SA EJAKULATOM

4.3.1. *POLUČIVANJE EJAKULATA*

Ejakulat se svakom jarcu uzimao jednom tjedno pomoću umjetne vagine, a postupak je uvijek provodila ista osoba na koju su jarčevi bili naviknuti (slika 4.2.). Kako bi se dobio veći volumen sjemene plazme, ejakulat je svakom jarcu uziman dvaput zaredom, s razmakom ne duljim od 15 minuta, tijekom tjednog prikupljanja. Korištene su standardne umjetne vagine za jarčeve, ali je za potrebe pokusa vanjska tvrda guma i unutarnja mekana guma skraćena za oko 4 cm, kao i ljevkasti gumeni nastavak između vagine i spermohvatača (slika 4.3.). Ove prilagodbe napravljene su kako bi se izbjegao kontakt ejakulata s unutarnjom gumom i lijevkom umjetne vagine, čime se omogućilo prikupljanje veće količine ejakulata izravno u spermohvatač i smanjilo vrijeme potrebno za spuštanje ejakulata sa stijenki vagine u spermohvatač.



Slika 4.2. Prikupljanje ejakulata od jarca uz prisustvo koze u estrusu (preuzeto od BERTA, 2019.)



Slika 4.3. Komponente prilagođene (skraćene) umjetne vagine za jarca (preuzeto od BERTA, 2019.)

Za prikupljanje ejakulata korištene su sterilne staklene graduirane epruvete kapaciteta 15 mL (slika 3.). Umjetne vagine su pripremljene unaprijed i napunjene vodom zagrijanom na više od 55 °C kako bi se osigurala unutarnja temperatura između 41 °C i 43 °C. Spermohvatač je bio omotan crnom spužvastom navlakom kako bi se ejakulat zaštitio od temperaturnog šoka i svjetla nakon prikupljanja (slika 4.5.).

Prilikom svakog skoka jarca, libido mužjaka je bodovan ocjenama od 1 do 5, prema sljedećim kriterijima: 1 = jarac ne pokazuje nikakav interes za kozu u estrusu; 2 = jarac pokazuje interes tek kad se nađe u neposrednoj blizini koze, njuška je, ali ne pokušava je zaskočiti; 3 = jarac pokazuje interes kad dođe blizu koze, njuška je i pokušava je zaskočiti, ali mu je potrebno puno vremena; 4 = jarac prilazi kozi, kratko je njuška, savija leđa i brzo skače; 5 = jarac pokazuje interes već dok vidi kozu u odjeljku i u nekoliko sekundi skače bez pripreme nakon što izađe iz odjeljka.



Slika 4.4. Spermohvatač (preuzeto od BERTA, 2019.)



Slika 4.5. Umjetna vagina pripremljena za jarca (preuzeto od BERTA, 2019.)

4.3.2. OPREMA ZA POLUČIVANJE I POSTUPAK SA EJAKULATOM

Kako bi se s ejakulatom moglo odmah postupati nakon prikupljanja na farmi, napravljen je modificirani prijenosni laboratorij (slika 4.6.) koji se sastojao od:

1. Kutije za prijenos umjetnih vagina s ugrađenim grijačem i termostatom, koja sprječava hlađenje pripremljenih umjetnih vagina (slika 4.7.).
2. Prijenosnog hladnjaka za transport ejakulata.
3. Prijenosnog inkubatora podešenog za održavanje temperature od 21 °C (slika 4.8.).
4. Centrifuge za centrifugiranje sadržaja u Eppendorf epruvetama pri sobnoj temperaturi, zaštićene od svjetlosti (slika 4.9.).
5. Binokularnog mikroskopa „Axiostar Plus“ (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Njemačka) s grijačem za spermije.
6. Fotometra „Accucell photometer tip 60CI0394“ (IMV Technologies, Normandija, Francuska) za određivanje koncentracije spermija u ejakulatu.
7. Kutije s umjetnim vaginama.
8. Prijenosnog seta za bojenje prema Bloom-u i Farelly-ju te ostale sitne opreme.



Slika 4.6. Oprema prijenosnog laboratorija za prikupljanje, ocjenu ejakulata i odvajanje sjemenske plazme



Slika 4.7. Kutija za prijenos umjetnih vagina s ugrađenim grijačem i termostatom (preuzeto od BERTA, 2019.)



Slika 4.8. Prijenosni inkubator za održavanje optimalne temperature (preuzeto od BERTA, 2019.)



Slika 4.9. Centrifuga za Eppendorf epruvete (preuzeto od BERTA, 2019.)

4.4. OCJENA EJAKULATA PRIJE SMRZAVANJA SPERMIJA

U istraživanje su bili uključeni samo oni ejakulati koji su zadovoljavali minimalne kriterije kakvoće sjemene rasplodnih jaraca. Nakon dobivanja ejakulata, odmah se mjeri volumen pomoću građiranog spermohvatača. Ejakulat se zatim prenosi u Eppendorf epruvetu s konusnim dnom. Iz epruvete se uzima 10 µL ejakulata za određivanje koncentracije, dok se po kapljica ejakulata koristi za procjenu gibljivosti i bojenje prema Bloom-u i Farelly-ju.

4.4.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE EJAKULATA

Koncentracija spermija u 1 mL ejakulata mjeri se pomoću elektronskog brojača „Accucell photometer tip 60CI0394“ (IMV technologies, Normandija, Francuska). Uređaj je prethodno kalibriran i podešen za brojanje spermija jarčeva. Nakon uzimanja ejakulata, pipetira se 10 µL sjemena i razrijedi u kiveti s 990 µL 0,9%-tne otopine NaCl-a. Ukupan broj spermija u ejakulatu izračunava se množenjem volumena s koncentracijom spermija u 1 mL ejakulata, dok se ukupni funkcionalni broj spermija (engl. TFSF - total functional sperm fraction) izračunava prema sljedećoj formuli: $TFSF = \text{ukupan broj spermija u ejakulatu} \times \text{gibljivi spermiji} \times \text{spermiji normalne morfologije}$ (RAMADAN i sur., 2009.).

4.4.2. ODREĐIVANJE GIBLJIVOSTI SPERMIJA

Gibljivost spermija procjenjuje se u nativnom ejakulatu na dva načina koristeći binokularni mikroskop s ugrađenim spermotermom „Axiostar Plus“ (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Njemačka). Pipetira se kapljica ejakulata od 10 µL i stavlja na prethodno zagrijanu predmetnicu. Procjena masovnog gibanja spermija obavlja se pod povećanjem od 100 x, a ocjena je izražena brojem od nula do četiri plusa (0 - potpuno mirovanje; + slabo valovito gibanje; ++ valovito gibanje; +++ jako valovito gibanje; ++++ vihorenje s izmjenama tamnijih i svjetlijih pruga). Nakon toga, kapljica ejakulata se prekriva staklenom pokrovnicom i pod povećanjem od 200 x na istom mikroskopu procjenjuje se gibljivost spermija u postotcima (%).

4.4.3. OCJENA VITALNOSTI SPERMIJA U EJAKULATU

Za procjenu postotka živih i mrtvih spermija u ejakulatu korišten je postupak supravitalnog bojenja prema Bloom-u s upotrebom eozina i nigrozina. Mala kapljica ejakulata se na zagrijanoj i odmašćenoj predmetnici pomiješa s većom kapljicom zagrijanog eozina, a zatim s dvostruko većom kapljicom zagrijanog nigrozina. Takva kapljica se ravnomjerno raširi

po predmetnici i ostavi da se osuši. Mrtvi spermiji, s oštećenom staničnom membranom, obojeni su eozinom i pojavljuju se crvenom bojom pri mikroskopiranju, dok živi spermiji ostaju bijeli, a njihova vidljivost poboljšava kontrast nigrozina. Osušeni preparati se pohranjuju u kutijicu za predmetna stakla, a postotak živih spermija (%) procjenjuje se sljedeći dan u Centru za umjetno osjemenjivanje „Varaždin“ koristeći binokularni mikroskop „Olympus BX50F“ (Olympus, Tokyo, Japan) pod povećanjem od 200 x. Za procjenu vitalnosti pregledano je najmanje 200 spermija.

4.4.4. MORFOLOŠKA OCJENA SPERMIJA U EJAKULATU

Udjel (%) morfološki normalnih i patoloških oblika spermija određuje se pomoću bojenja prema Farelly-ju s komercijalnim kompletom (Minitube, Tiefenbach, Njemačka). Kapljica ejakulata se na odmašćenoj predmetnici ravnomjerno raširi i osuši. Predmetnica s osušenim ejakulatom uranja se u otopinu za fiksaciju razmaza (otopina A) na 10 sekundi, zatim u otopinu anilinskog modrila (otopina B) na 20 sekundi, a nakon ispiranja vodom u otopinu gencijan ljubičaste boje (otopina C) na 5 sekundi. Nakon zadnje otopine, predmetnica se dobro ispire vodom i ostavlja da se osuši 12 sati. Spermiji su obojeni plavo-ljubičastom bojom koja omogućuje diferencijalnu vizualizaciju glave, akrosoma, ekvatorijalnog i središnjeg dijela te repa spermija. Osušeni preparati se pohranjuju u kutijicu za predmetna stakla, a postotak morfološki normalnih i patoloških spermija procjenjuje se sljedeći tjedan u Centru za umjetno osjemenjivanje „Varaždin“ koristeći fazno-kontrastni mikroskop „Olympus BX50F“ (Olympus, Tokyo, Japan), prvo pod srednjim povećanjem, a potom pod imerzijom (povećanjem od 1000 x). Za ocjenu udjela morfološki normalnih i patoloških oblika glave i repa spermija pregledano je najmanje 200 spermija po preparatu.

4.5. SMRZAVANJE EJAKULATA

Nakon izdvajanja sjemene plazme, talog spermija u Eppendorf epruveti se pomiješao sa sintetskim razrijeđivačem za sjeme (bez žumanjka) AndroMed® (Minitube, Njemačka, Ref. 13503/1200) na sobnoj temperaturi i polako miješao dok se talog nije odvojio od dna epruvete. Spermiji su se razrijedili s 10 mL razrijeđivača u većoj sterilnoj plastičnoj epruveti i pohranjuju prvo u transportni hladnjak, a zatim, nakon odlaska s farme, u obični hladnjak (+4 °C) na daljnje hlađenje kroz 24 sata prije smrzavanja u Centru za umjetno osjemenjivanje „Varaždin“. Nakon 24 sata, pajete se iz hladnjaka premještaju na metalne rampe za duboko smrzavanje. Rampe sa sjemenom se prebacuju u uređaj za automatsko duboko smrzavanje sjemena

(DIGITCOOL 5300, serija: AD12211/D, INSTRUMENTS DE MEDICINE VETERINAIRE, FRANCE) na temperaturu od +4 °C. Pajete se ostavljaju 10 minuta za stabilizaciju temperature prije početka smrzavanja. Smrzavanje traje 7 minuta do temperature od -133 °C, uz slijedeći pad temperature po minutama: 0 min = +4 °C; 1 min = -2 °C; 2 min = -6 °C; 3 min = -17 °C; 4 min = -58 °C; 5 min = -100 °C; 6 min = -115 °C; 7 min = -133 °C. Označene pajete (40 pajeta po ejakulatu) ručno se prebacuju iz rampe u goblete s tekućim dušikom (-196 °C) i pohranjuju u kontejner s tekućim dušikom do analize.

4.5.1. OCJENA EJAKULATA NAKON OTAPANJA

Uzorci smrznutih ejakulata analizirani su u Naučnom institutu za veterinarstvo u Novom Sadu, Srbija. Otapanje duboko smrznutih ejakulata izvedeno je naglim uranjanjem pajete u vodenu kupelj (+38 °C) kroz 30 sekundi. Pajete su potom obrisane filter papirom, a oznaka pajete je očitana.

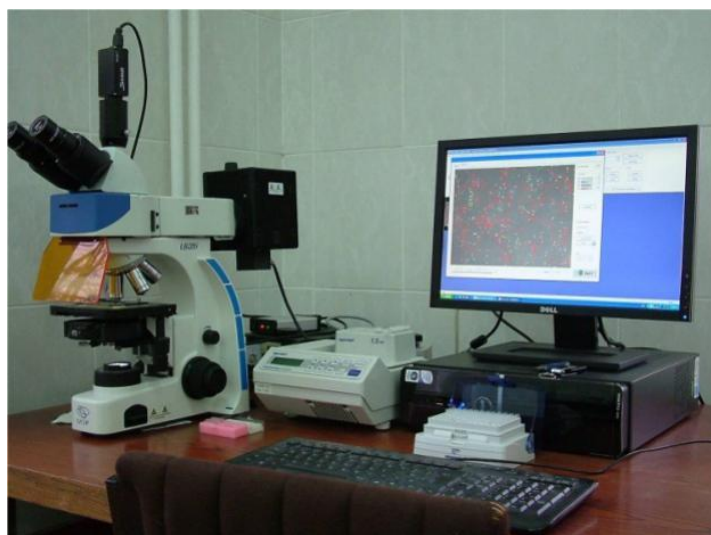
4.5.1.1. CITOLOŠKO ISPITIVANJE EJAKULATA

Nakon otapanja, dio ejakulata iz pajete je uzet za citološko-morfološku analizu. Za ovu analizu pripremljeni su preparati za direktnu mikroskopiju koristeći supravitalno bojenje prema Hancock-u (Hancock 2: tripan modriilo/eozin-nigrozín). Boja je pripremljena prokuhavanjem 0,67 g eozina, 0,2 g tripan modrila i 10 g nigrozina u 100 mL vode. Kapljica ejakulata pomiješana je s jednakom kapljicom boje na zagrijanom predmetnom staklu, a zatim je staklenim štapićem napravljen razmaz koji se osuši na spermotermu. Razmasci su analizirani pomoću fazno-kontrastnog svjetlosnog mikroskopa (Olympus, Japan) s imerzijom pod povećanjem od 1000 x. Analizom su određeni odnos živih i mrtvih stanica, stanje intaktnih i oštećenih akrosoma spermija, prisutnost protoplazmatskih kapljica, te postotak primarnih, sekundarnih i ukupnih patoloških oblika spermatozoida (BARTH i OKO, 1989.).

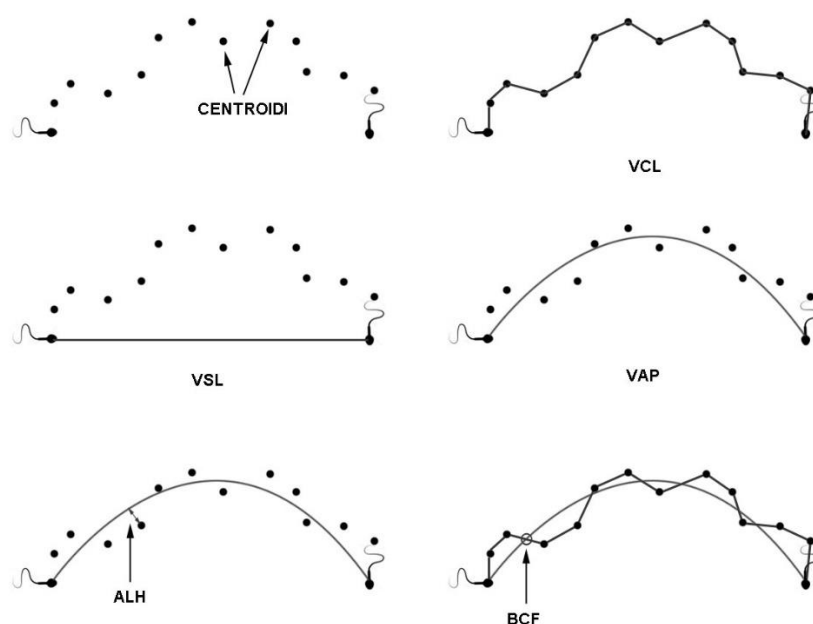
4.5.1.2. KOMPJUTERSKI POTPOMOGNUTA ANALIZA EJAKULATA - CASA

Kompjuterski potpomognuta analiza ejakulata provedena je pomoću aparata ISAS Proiser, model V.1.2., Španija. Uzorak odmrznutog sjemena (5 µL) nanesen je na lejekomorice (Proiser, Valencija, Španija) dubine 20 µm koje su postavljene na grijano postolje mikroskopa. Nakon prestanka pasivnog gibanja spermija, snimljeno je svih sedam polja komorice. Program je bio podešen za analizu 25 slika u sekundi, a ukupna ekspozicija trajala je 2 sekunde (ukupno 50 sekvenci). Analizom su određeni sljedeći pokazatelji:

- Krivolinijska brzina (engl. VCL - Curvilinear Velocity): izražena u $\mu\text{m/s}$, predstavlja prosječnu brzinu spermija na njegovoj krivolinijskoj putanji;
- Pravolinijska brzina (engl. VSL - Straight-Line Velocity): izražena u $\mu\text{m/s}$, predstavlja prosječnu brzinu spermija na pravolinijskoj putanji (putanja koja spaja prvu i posljednju slikanu poziciju spermija);
- Prosječna brzina (engl. VAP - Average Path Velocity): izražena u $\mu\text{m/s}$, predstavlja prosječnu brzinu spermija na njegovoj prosječnoj putanji (putanja izračunata algoritmom CASA uređaja, koja ispravlja krivolinijsko gibanje spermija);
- Amplituda lateralnog otklona glave (engl. ALH - Amplitude of Lateral Head Displacement): izražena u μm , predstavlja amplitudu lateralnog pomaka glave spermija u odnosu na prosječnu putanju;
- Indeks linearnosti (engl. LIN - Linearity): izražen u %, predstavlja linearnost krivolinijske putanje i izračunava se kao omjer pravolinijske i krivolinijske brzine (VSL/VCL);
- Indeks oscilacije (engl. WOB - Wobble): izražen u %, predstavlja stupanj oscilacije prave putanje u odnosu na prosječnu putanju spermatozoida, a izračunava se kao omjer prosječne i krivolinijske brzine (VAP/VCL);
- Pravolinijski indeks (engl. STR - Straightness): izražen u %, predstavlja linearnost na prosječnoj putanji, a izračunava se kao omjer pravolinijske i prosječne brzine (VSL/VAP);
- Frekvencija prelaska pravolinijske putanje (engl. BCF - Beat Cross Frequency): izražena u Hz, predstavlja prosječan broj prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje u sekundi.



Slika 4.10. Kompjuterski potpomognuta analiza ejakulata



Slika 4.11. Standardna terminologija pokazatelja mjerenih kompjuterski potpomognutom analizom spermija. VCL (engl. Curvilinear Velocity) - Krivolinijska brzina; VSL (engl. Straight-Line Velocity) - Pravolinijska brzina; VAP (engl. Average Path Velocity) - Prosječna brzina; ALH (engl. Amplitude of Lateral Head Displacement) - Amplituda lateralnog otklona glave; BCF (engl. - Beat Cross Frequency) - Frekvencija prelaska pravolinijske putanje

4.6. POSTUPAK BOJENJA RAZMAZA EJAKULATA ZA MORFOMETRIJSKU ANALIZU SPERMIJA

Odmrznuto sjeme jarčeva koristilo se za izradu razmaza na stakalcu te za bojanje metodom Spermac gotovim reagensima (Minitube, Tiefenbach, Njemačka), dijagnostičkom tehnikom koja se uobičajeno primjenjuje za vizualizaciju glave, akrosoma, ekvatorijalnog područja, središnjeg dijela i repa spermija, kako bi se identificirale moguće morfološke abnormalnosti navedenih struktura. Tanki razmaz načinjen je na prethodno očišćenom i odmašćenom stakalcu, koje je potom uronjeno u fiksator na 5 minuta. Nakon fiksacije, stakalca su sušena na grijaćoj ploči pri temperaturi od 37 °C tijekom 15 minuta. Zatim su stakalca ispirana destiliranom vodom, nakon čega je provedeno bojanje prema sljedećim koracima: a) uranjanje razmaza u 50 mL crvene otopine (Spermac A) na 1 minutu, b) ispiranje destiliranom vodom, c) uranjanje u 50 mL blijedozelene otopine (Spermac B) na 1 minutu, d) ispiranje destiliranom vodom, e) uranjanje u 50 mL tamnozeleno otopine (Spermac C) također na 1 minutu, te f) završno ispiranje destiliranom vodom. Nakon bojanja, preparati su osušeni na grijaćoj ploči pri temperaturi od 37 °C.

4.7. MORFOMETRIJSKA ANALIZA SPERMIJA

Računalna analiza slika provedena je na osobnom računalu uz pomoć programa „SFORM“ (VAMSTEC, Zagreb, Hrvatska). Ovaj sustav koristi visoko-rezolutnu boju kameru (Donpisha 3CCD) za digitalizaciju slika sa svjetlosnog mikroskopa Olympus BX 41 pri povećanju od 40x, koje se zatim prenose na računalo. Morfometrijska analiza spermija jarčeva provedena je na obojenim razmazima pomoću metode prema Spermac metodi, koja omogućuje prikaz središnjeg dijela repa spermija. Analizirano je ukupno 30 obojana razmaza sa 100 spermija na svakom razmazu, što ukupno iznosi 3000 spermija. U analizu su uključene samo glave spermija koje se nisu preklapale s drugim spermijima ili nečistoćama, te repovi koji nisu bili presavijeni. Granice glave, središnjeg dijela i repa spermija označene su interaktivno uz pomoć računarskog miša (Slika 4.12.).

Za glavu i središnji dio spermija izmjerene su sljedeće karakteristike: površina (μm^2), opseg (μm), minimalni i maksimalni polumjer (μm), duljina i širina (μm). Za rep spermija mjerena je samo duljina u mikrometrima. Pokazatelji oblika glave spermija izračunati su prema HIDALGO i sur. (2005.), uključujući: pravilnost (engl. regularity; $\pi \times \text{duljina} \times \text{širina} / 4 \times \text{površina}$), naboranost (engl. rugosity; $4\pi \times \text{površina} / \text{opseg}^2$), eliptičnost (engl. ellipticity; $\text{duljina} / \text{širina}$) i elongacija (engl. elongation; $(\text{duljina} - \text{širina}) / (\text{duljina} + \text{širina})$). Također su izračunati ukupna duljina spermija ($\text{duljina glave} + \text{duljina repa}$), kao i različiti omjeri primarnih pokazatelja: duljina glave u odnosu na duljinu spermija, duljina glave u odnosu na

duljinu repa, duljina repa u odnosu na duljinu spermija, opseg glave u odnosu na duljinu spermija, površina glave u odnosu na duljinu spermija, i duljina glave x širina glave u odnosu na duljinu spermija.



Slika 4.12. Morfometrijska analiza spermija jarčeva na osobnom računalu korištenjem programa „SFORM“ (VAMSTEC, Zagreb, Hrvatska)



Slika 4.13. Sustav za morfometrijsku analizu stanica

4.8. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Statistički podaci analizirani su pomoću programskog paketa SAS 9.4 (Statistical Analysis Software 2002-2012 by SAS Institute Inc., Cary, SAD). Deskriptivna statistika morfometrijskih i kinetičkih podataka napravljena je pomoću modula PROC MEANS i PROC FREQ. Kako bi se smanjio utjecaj ekstremnih vrijednosti izračunate su „trimmed i winsorized“ srednje vrijednosti pomoću procedure UNIVARIATE kao deskriptivna statistika.

Korištena su tri glavna modela statističke analize. Prvi model bio je multivarijatna regresijska linearna analiza (MRLA) koja je rađena pomoću REG procedure. Prije same analize izvršen je odabir varijabli koje ulaze u konačni model pomoću prilagođenog koeficijenta determinacije (R^2). Osim pojedinih morfometrijskih varijabli, u ovaj model, uključivale su se i glavne komponente odnosno faktori sačinjeni od najvažnijih morfometrijskih pokazatelja za svaki faktor (F1 – F5). Osim ukupne značajnosti modela te pojedinačne statističke značajnosti testirao se i faktor inflacije varijance (VIF) radi dokazivanja da regresori međusobno ne koreliraju. Ako je $VIF > 10$, postoji kolinearnost te se u tom slučaju rezultati nisu prihvaćali

iako su statistički značajni. Za svaki parametar procenjen je standardizirani beta koeficijent (β) koji je uzet u obzir samo u slučaju statističke značajnosti ($p < 0,05$) kako bi se usporedila snagu učinka svake pojedinačne nezavisne varijable sa zavisnom varijablom. Rezultati u tablicama su izraženi prilagođenim faktorom determinacije, faktorom inflacije i standardiziranim beta koeficijentom na razini statističke značajnosti $P < 0,05$.

Drugi korišteni model bio je multivarijatna naliza varijance (MANOVA) koja je rađena pomoću GLM procedure temeljene na kriteriju Wilksove lambde. Isto tako, prije analize izvršen je odabir varijabli upotrebom postepenog odabira (stepwise selection) GLMSELECT procedure. Prije analize izvršeno je grupiranje svakog kinetičkog parametra tako da bi se izračunala srednja vrijednost parametra te se od te vrijednosti napravila podjela na grupu s većim i grupu s manjim vrijednostima. Ponekad su se podjele grupa zbog specifičnosti analize radile prema određenim formulama koristeći nekoliko kinetičkih pokazatelja zajedno. U svrhu analize trodimenzionalne putanje spermija konvertiranjem dvodimenzionalne putanje, izračunata je Z – os pomoću matematičke formule $VCL / (BCF / 2 \times ALH)$. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti najmanjih kvadrata (LSM - least squares means) i standardna pogreška. Za usporedbu srednjih vrijednosti korištena je Tukey-Kramer-ova metoda višestrukih usporedbi na razini statističke značajnosti $P < 0,05$.

Treći korišteni model bio je multivarijatna analiza grupiranja temeljena na analizi glavnih komponenta u nekoliko koraka. Prije same analize, pomoću pokazatelja glave spermija (duljina, širina, površina i opseg), izračunata su četiri sekundarna pokazatelja oblika glave spermija: eliptičnost = duljina/širina; elongacija = $[(duljina - širina)/(duljina + širina)]$; naboranost = $[4\pi \times površina/opseg^2]$; pravilnost = $[\pi \times duljina \times širina/4 \times površina]$. U prvom koraku učinila se analiza glavnih komponenta (PROC FACTOR) kako bi se dobile karakteristične vrijednosti (eigenvalues) morfometrijskih pokazatelja pomoću Kaiserov-og kriterija ($\lambda \geq 1$) kako bi se odredio broj glavnih komponenta. U drugom koraku pomoću „aligned box“ vrijednosti u HPCLUS proceduri određen je broj grupa ili subpopulacija spermija. U trećem koraku da bi se bolje interpretirali podatci dobivenih subpopulacija spermija učinjena je postupna diskriminacijska analiza (PROC STEPDISC) i testiranje netipičnih vrijednosti (PROC FASTCLUS). Završna analiza bila je testiranje razlika u distribuciji subpopulacija spermija između skupina pomoću Hi-kvadrat testa u proceduri FREQ. Rezultati su izraženi kao postotci na razini statističke značajnosti $P < 0,05$. Svi grafikoni načinjeni su pomoću procedure SGPLOT u rezoluciji od 300 dpi.

5. REZULTATI

5.1. DESKRIPTIVNI PODATCI RAZLIČITIH POKAZATELJA BRZINE I GIBANJA SPERMIJA

U tablici 1. prikazani su deskriptivni podatci pokazatelja brzine i gibanja spermija jarčeva nakon otapanja dobivenih kompjuterskom analizom spermija (CASA). Najveći koeficijent varijacije imali su prosječna brzina spermija na pravolinijskoj putanji (VSL) i prosječna brzina spermija na njegovoj prosječnoj putanji (VAP) što je u biti izračunata vrijednost CASA-e.

Tablica 5.1. Deskriptivni podatci različitih pokazatelja brzine i gibanja spermija jarčeva pasmine francuska alpina nakon otapanja.

Parametri	Srednja vrijednost	Medijan	Standardna devijacija	Minimalne i maksimalne vrijednosti	Donji i gornji kvartil	Koeficijent varijacije (%)
VCL	93,0	91,6	14,5	64,4-116,9	78,5-107,1	15,6
VSL	50,0	49,7	12,9	26,1-72,2	40,6-61,1	25,8
VAP	67,1	65,9	17,0	38,0-97,2	51,1-82,9	25,3
LIN	60,0	54,6	8,3	34,3-66,5	46,6-59,8	15,7
STR	74,5	74,3	5,0	61,1-82,1	70,8-79,3	6,8
WOB	71,0	71,3	9,3	48,5-83,4	64,9-79,9	13,0
ALH	3,1	3,1	0,3	2,3-3,9	2,8-3,1	11,3
BCF	9,7	9,7	1,5	7,0-12,5	8,1-11,2	16,2

VCL – prosječna brzina spermija na njegovoj krivolinijskoj putanji; VSL - prosječna brzina spermija na njegovoj pravolinijskoj putanji; VAP - prosječna brzina spermija na njegovoj prosječnoj putanji; LIN - linearnost krivolinijske putanje spermija (VSL/VCL); STR - pravocrtnost putanje spermija (VSL/VAP); WOB - stupanj oscilacije stvarne putanje spermija u odnosu na prosječnu putanju spermija (VAP/VCL); ALH - lateralni odklon glave u odnosu na prosječnu putanju spermija; BCF - prosječan broj prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje spermija

U tablici 5. 2. prikazane su međusobne korelacije pokazatelja brzine i gibanja spermija. Pozitivno međusobno koreliraju parametri brzine spermija (VCL, VSL, VAP), a s njima još pozitivno koreliraju parametri progresivnosti gibanja (LIN i WOB). Pravocrtnost putanje (STR) kao jedan od najvažnijih parametara progresivnosti gibanja spermija pozitivno korelira samo s linearnošću krivolinijske putanje spermija (LIN), a negativno s lateralnim odklonom glave spermija (ALH). Parametar koji pokazuje prosječan broj prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje spermija (BCF) negativno korelira sa svim pokazateljima brzine spermija (VCL, VSL, VAP) te sa dva pokazatelja progresivnosti spermija (LIN, WOB).

Tablica 5.2. Međusobne korelacije različitih pokazatelja brzine i gibanja spermija

	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
VCL								
VSL	0,83 <0,0001							
VAP	0,92 <0,0001	0,95 <0,0001						
LIN	0,42 0,01	0,84 <0,0001	0,70 <0,0001					
STR	-0,20 n.s.	0,24 n.s.	-0,03 n.s.	0,59 0,0005				
WOB	0,62 0,0002	0,89 <0,0001	0,87 <0,0001	0,89 <0,0001	0,18 n.s.			
ALH	0,58 0,0007	0,13 n.s.	0,25 n.s.	-0,32 n.s.	-0,38 0,03	-0,19 n.s.		
BCF	-0,45 0,01	-0,54 0,001	-0,62 0,0003	-0,47 0,008	0,22 n.s.	-0,69 <0,0001	0,07 n.s.	

VCL – prosječna brzina spermija na njegovoj krivolinijskoj putanji; VSL - prosječna brzina spermija na njegovoj pravolinijskoj putanji; VAP - prosječna brzina spermija na njegovoj prosječnoj putanji; LIN - linearnost krivolinijske putanje spermija (VSL/VCL); STR - pravocrtnost putanje spermija (VSL/VAP); WOB - stupanj oscilacije stvarne putanje spermija u odnosu na prosječnu putanju spermija (VAP/VCL); ALH - lateralni odklon glave u odnosu na prosječnu putanju spermija; BCF - prosječan broj prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje spermija

5.2. DESKRIPTIVNI PODATCI RAZLIČITIH MORFOMETRIJSKIH POKAZATELJA SPERMIJA

U tablici 5.3. i 5.4. prikazani su različiti deskriptivni podatci morfometrijskih parametara glave, spojnog dijela i repa spermija. Najveći koeficijenti varijacije glave spermija zabilježeni su kod eliptičnosti i elongacije glave spermija (9,75 %, 13,79 %) što su pokazatelji dobiveni formulom kombinirajući duljinu i širinu glave spermija. Najveći koeficijenti varijacije spojnog dijela spermija zabilježeni su kod širine i minimalnog polumjera spermija (22,0 %, 37,7 %). U tablici 5.5. prikazani su pokazatelji različitih morfometrijskih pokazatelja omjera glave, spojnog dijela i repa spermija. Od ukupne duljine spermija, duljina glave iznosi oko 15 %, dok duljina glavnog dijela repa (rep bez spojnog dijela spermija) iznosi oko 62 % ukupne duljine spermija u jarčeva. Spojni dio repa zauzima oko 22 % ukupne duljine spermija. Najveći koeficijent varijacije zabilježen je kod omjera umnoška širine i duljine glave s ukupnom duljinom spermija (11,5 %). Najmanji koeficijent varijacije od svih morfometrijskih pokazatelja spermija zabilježen je u omjeru duljine repa s ukupnom duljinom spermija (1,5 %).

Tablica 5.3. Deskriptivni pokazatelji različitih morfometrijskih pokazatelja glave spermija

Pokazatelji glave spermija	Ukupno						Varijacije između jarčeva			
	Srednja vrijednost	"Trimmed" srednja vrijednost (10,03%)	"Winsorized" srednja vrijednost (10,03%)	Medijan	Standardna devijacija	Koeficijent varijacije (%)	Interval srednje vrijednosti	Interval medijane vrijednosti	Interval standardne devijacije	Interval koeficijenta varijacije (%)
Duljina (μm)	9,27	9,27	9,27	9,27	0,54	5,85	8,98-9,58	8,93-9,58	0,39-0,65	4,21-7,01
Širina (μm)	4,78	4,78	4,78	4,77	0,36	7,50	4,59-5,00	4,60-5,04	0,25-0,43	5,03-9,02
Minimalni polumjer (μm)	2,08	2,08	2,08	2,06	0,18	8,68	2,00-2,22	1,99-2,22	0,13-0,21	6,32-10,10
Maksimalni polumjer (μm)	4,84	4,84	4,84	4,84	0,28	5,92	4,69-4,99	4,68-4,99	0,22-0,33	4,64-6,91
Površina (μm ²)	35,96	35,97	35,95	36,40	2,84	7,90	33,87-38,14	33,71-38,21	1,86-3,47	4,92-9,45
Opseg (μm)	24,62	24,61	24,61	24,59	1,09	4,45	23,95-25,34	24,01-25,28	0,69-1,33	2,85-5,41
Eliptičnost	1,94	1,94	1,94	1,94	0,18	9,75	1,87-2,07	1,85-2,06	0,13-0,22	7,28-11,74
Elongacija	0,31	0,31	0,31	0,32	0,04	13,79	0,30-0,34	0,29-0,34	0,03-0,05	9,76-16,75
Naboranost	0,74	0,74	0,74	0,74	0,03	5,32	0,72-0,77	0,72-0,77	0,02-0,04	3,51-5,87
Pravilnost	0,96	0,96	0,96	0,96	0,04	4,31	0,95-0,98	0,94-0,98	0,02-0,05	2,71-5,78

Eliptičnost = duljina / širina; Elongacija = [(duljina – širina) / (duljina + širina)]; Naboranost = $[4\pi \times \text{površina} / \text{opseg}^2]$; Pravilnost = $[\pi \times \text{duljina} \times \text{širina} / 4 \times \text{površina}]$

Tablica 5.4. Deskriptivni pokazatelji različitih morfometrijskih pokazatelja spojnog dijela i repa spermija

Pokazatelj i spojnog dijela spermija i repa spermija	Ukupno						Varijacije između jarčeva			
	Srednja vrijednost	"Trimmed" srednja vrijednost (10,03%)	"Winsorized" srednja vrijednost (10,03%)	Medijan	Standardna devijacija	Koeficijent varijacije (%)	Interval srednje vrijednosti	Interval medijane vrijednosti	Interval standardne devijacije	Interval koeficijenta varijacije (%)
Duljina (μm)	13,63	13,57	0,01	13,55	1,04	7,68	12,95-14,14	12,97-14,02	0,65-1,34	4,85-9,80
Širina (μm)	1,94	1,90	1,92	1,87	0,42	22,00	1,72-2,33	1,66-2,28	0,33-0,53	17,34-28,38
Minimalni polumjer (μm)	0,44	0,43	0,43	0,41	0,16	37,75	0,37-0,52	0,37-0,55	0,13-0,18	29,13-42,45
Maksimalni polumjer (μm)	7,09	7,06	7,07	7,04	0,57	8,12	6,77-7,37	6,73-7,28	0,39-0,71	5,62-9,89
Površina (μm ²)	19,04	18,93	18,98	18,80	2,67	14,04	17,30-22,21	17,09-22,11	1,73-3,44	9,16-16,88
Opseg (μm)	30,92	30,79	30,83	30,72	2,26	7,32	29,50-31,94	29,44-31,79	1,39-2,86	4,47-9,10
Duljina repa (μm)	51,75	52,21	52,05	52,37	4,12	7,96	49,41-53,55	50,48-54,39	2,73-6,03	5,23-12,10

Tablica 5.5. Deskriptivni pokazatelji različitih morfometrijskih pokazatelja omjera glave, spojnog dijela i repa spermija

	Ukupno						Varijacije između jarčeva			
	Srednja vrijednost	"Trimmed" srednja vrijednost (10,03%)	"Winsorized" srednja vrijednost (10,03%)	Medijan	Standardna devijacija	Koeficijent varijacije (%)	Interval srednje vrijednosti	Interval medijane vrijednosti	Interval standardne devijacije	Interval koeficijenta varijacije (%)
Ukupna duljina spermija	61,02	61,46	61,31	61,63	4,24	6,96	58,73-63,00	60,04-63,50	2,92-6,07	4,74-10,22
Duljina glavnog dijela repa	38,11	38,56	38,39	38,79	4,05	10,62	35,62-39,90	37,16-40,69	2,48-6,06	6,35-16,79
Duljina glave / duljina repa	0,18	0,17	0,17	0,17	0,01	10,32	0,17-0,19	0,17-0,18	0,01-0,03	6,82-15,48
Duljina repa / ukupna duljina	0,84	0,84	0,84	0,84	0,01	1,53	0,83-0,85	0,84-0,85	0,008-0,02	1,02-2,43
Opseg glave / ukupna duljina	0,40	0,40	0,40	0,40	0,03	8,21	0,39-0,42	0,38-0,41	0,02-0,05	5,37-12,18
Površina glave / ukupna duljina	0,59	0,58	0,58	0,58	0,06	10,64	0,56-0,63	0,54-0,62	0,04-0,08	7,42-14,85
Duljina glave * širina glave / ukupna duljina	0,73	0,72	0,72	0,72	0,08	11,56	0,69-0,77	0,68-0,76	0,06-0,11	8,13-14,89
Duljina glave / ukupna duljina	0,15	0,15	0,15	0,15	0,01	8,50	0,14-0,16	0,14-0,15	0,008-0,02	5,76-12,51
Duljina spojnog dijela / ukupna duljina	0,22	0,22	0,22	0,22	0,02	9,84	0,21-0,23	0,20-0,23	0,01-0,03	5,85-13,49
Duljina glavnog dijela repa / ukupna duljina	0,62	0,62	0,62	0,62	0,03	4,97	0,60-0,63	0,61-0,64	0,01-0,04	2,63-8,10

5.3. SUBPOPULACIJE SPERMIJA NA OSNOVU MORFOMETRIJSKIH POKAZATELJA GLAVE, SPOJNOG DIJELA I REPA SPERMIJA

Karakteristične vrijednosti morfometrijskih pokazatelja spermija u analizi glavnih komponentata prikazane su u tablici 5.6. Analizom glavnih komponentata morfometrijskih pokazatelja glave te spojnog dijela i repa spermija dobiveno je 5 glavnih komponentata (faktora) čiji je karakteristični korijen (λ) ≥ 1 . Tih pet faktora objašnjavaju ukupno 86,7 % varijance. Faktor 1 (izduljenost glave spermija) ima najveći karakteristični korijen ($\lambda=4,01$) te objašnjava najviše varijance (30,9 %). Usmjeren je na mjere izduljenosti glave (duljina, elongacija i eliptičnost glave spermija) te je u negativnoj korelaciji s mjerom naboranost glave. U faktoru 1 najveće vrijednosti imale su elongacija i eliptičnost glave (0,95 i 0,94). Faktor 2 je druga po veličini komponenta koja objašnjava 21,8 % od ukupne varijance te mu karakteristični korijen (λ) iznosi 2,83. Usmjeren je na mjere veličine glave spermija (širina, površina i opseg glave spermija), a najveća vrijednost ima površina glave (0,84). Faktor 3 je usmjeren na mjere veličine spojnog dijela spermija te obuhvaća duljinu, površinu i opseg spojnog dijela spermija. Objašnjava 17 % od ukupne varijance svih komponentata uz karakteristični korijen (λ) od 2,21, a najveće vrijednosti imaju opseg i duljina spojnog dijela spermija (0,79 i 0,75). Faktor 4 usmjeren je na duljinu repa (0,63) te je u negativnoj korelaciji sa širinom spojnog dijela spermija (-0,74). Obuhvaća samo 9 % od ukupne varijance, a karakteristični korijen (λ) je skoro duplo manji od prethodnog te iznosi 1,16. Posljednji, peti faktor usmjeren je samo na mjeru pravilnosti glave (0,86) te mu je karakteristični korijen (λ) tek nešto veći od 1 (1,03), a obuhvaća 7,9 % od ukupne varijance svih faktora. U tablici nisu prikazane pozitivne i negativne korelacije jednake ili manje od 0,50.

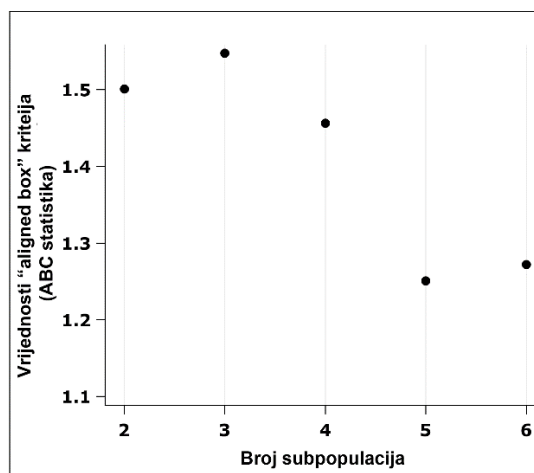
Tablica 5.6. Karakteristične vrijednosti morfometrijskih pokazatelja glave te duljine spojnog dijela i repa spermija s karakterističnim korjenom ($\lambda \geq 1$ - Kaiserov kriterij).

MORFOMETRIJSKI POKAZATELJI GLAVE I REPA SPERMIJA		Faktor 1 (Faktor izduljenosti glave spermija)	Faktor 2 (Faktor veličine glave spermija)	Faktor 3 (Faktor veličine spojnog dijela spermija)	Faktor 4 (Faktor širine spojnog dijela i duljine repa spermija)	Faktor 5 (Faktor pravičnosti glave spermija)
Pokazatelji veličine glave spermija	Duljina (μm)	0,71*	0,53	/	/	/
	Širina (μm)	-0,67	0,70*	/	/	/
	Površina (μm^2)	/	0,84*	/	/	/
	Opseg (μm)	/	0,74*	/	/	/
Pokazatelji oblika glave spermija	Eliptičnost	0,94*	/	/	/	/
	Elongacija	0,95*	/	/	/	/
	Naboranost	-0,79*	/	/	/	/
	Pravičnost	/	/	/	/	0,86*
Pokazatelji veličine spojnog dijela spermija	Duljina (μm)	/	/	0,75*	/	/
	Širina (μm)	/	/	/	-0,74*	/
	Površina (μm^2)	/	/	0,65*	/	/
	Opseg (μm)	/	/	0,79*	/	/
Rep spermija	Duljina (μm)	/	/	/	0,63*	/
Karakteristični korijen (λ) i objašnjena varijanca (%)		4,01 (30,9)	2,83 (21,8)	2,21 (17,0)	1,16 (9,0)	1,03 (7,9)
Kumulativno objašnjena varijanca %		86,7				

*Najvažniji pokazatelji pojedinog faktora ili komponente koji imaju najveću vrijednost između svih faktora. Nisu prikazani pokazatelji čija korelacija je $\leq \pm 0,50$

Eliptičnost = duljina / širina; Elongacija = [(duljina – širina) / (duljina + širina)]; Naboranost = $[4\pi \times \text{površina} / \text{opseg}^2]$; Pravičnost = $[\pi \times \text{duljina} \times \text{širina} / 4 \times \text{površina}]$

Uzimanjem najvažnijih pokazatelja pojedinih faktora, vrijednosti „aligned box“ kriterija (ABC statistika – aligned box criterion) pokazuju da je najpreciznija procjena broja grupa ili subpopulacija spermija 3 (slika 5.1.).



Slika 5.1. Odabir broja subpopulacija spermija pomoću vrijednosti „aligned box“ kriterija

Na osnovu morfometrijskih pokazatelja spermija, analizom grupiranja (tablica 5.7.) dobivene su tri dobro definirane subpopulacije spermija (S1, S2 i S3). Prva subpopulacija spermija (S1) čini samo 11,9 % ukupne populacije te je sačinjena od spermija s najmanjom eliptičnošću, elongacijom i pravilnošću glave dok je s druge strane naboranost glave najveća među tri subpopulacije. Isto tako, rep spermija ove subpopulacije je najkraći dok je širina spojnog dijela najveća. Druga subpopulacija spermija (S2) čini 44,8 % ukupne populacije te je sačinjena od najvećih spermija čija glava ima najveću duljinu, širinu, opseg i površinu. Ovi spermiji imaju i najveću eliptičnost i elongaciju i pravilnost glave te najmanju naboranost glave. Spojni dio spermija ove subpopulacije ima najveću duljinu, površinu i opseg te imaju najduži rep. Treća subpopulacija spermija (S3) čini 43,3 % ukupne populacije te su to najmanji spermiji. Glava i spojni dio ovih spermija imaju najmanju duljinu, širinu površinu i opseg.

Tablica 5.7. Subpopulacije spermija jarčeva pasmine Francuska alpina (S1, S2, S3) dobivene analizom grupiranja morfometrijskih pokazatelja glave, spojnog dijela i repa spermija izraženih kao srednja vrijednost i standardna devijacija

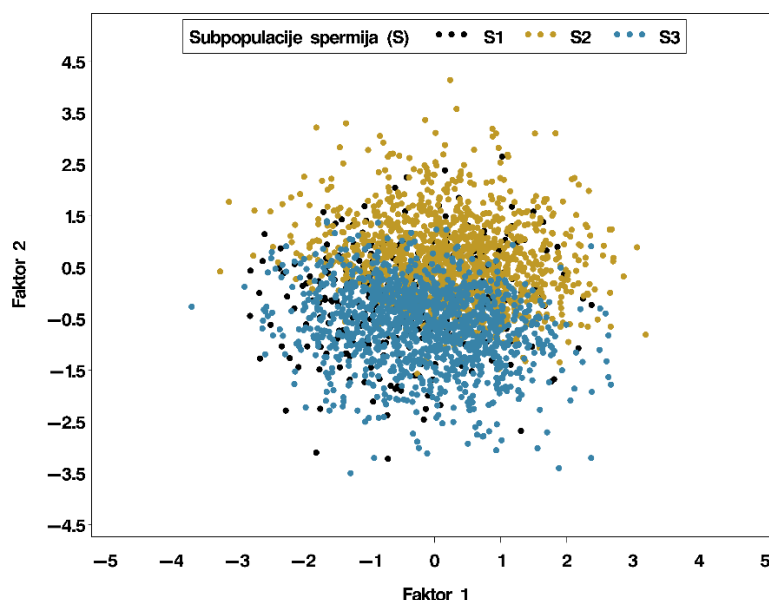
Subpopulacije spermija	N (%)	Udaljenost između centroida klastera	Pokazatelji oblika glave spermija			
			Eliptičnost	Elongacija	Naboranost	Pravilnost
S1	358 (11,9)	8,75	1,91±0,19	0,312±0,044	0,753±0,038	0,965±0,040
S2	1343 (44,8)	5,11	1,96±0,18	0,321±0,043	0,741±0,039	0,972±0,041
S3	1300 (43,3)	5,11	1,94±0,19	0,317±0,044	0,747±0,039	0,966±0,042
Pokazatelji veličine glave spermija						
			Duljina (μm)	Širina (μm)	Površina (μm ²)	Opseg (μm)
S1	358 (11,9)	8,75	9,20±0,56	4,82±0,33	36,0±2,7	24,5±1,0
S2	1343 (44,8)	5,11	9,50±0,49	4,87±0,34	37,4±2,4	25,2±0,9
S3	1300 (43,3)	5,11	9,04±0,48	4,68±0,35	34,4±2,3	24,0±0,9
Pokazatelji veličine spojnog dijela spermija						
			Duljina (μm)	Širina (μm)	Površina (μm ²)	Opseg (μm)
S1	358 (11,9)	8,75	13,32±1,19	2,11±0,52	18,8±2,6	30,5±2,5
S2	1343 (44,8)	5,11	14,06±1,04	1,99±0,40	20,3±2,5	31,9±2,2
S3	1300 (43,3)	5,11	13,26±0,81	1,85±0,40	17,7±2,0	30,0±1,6

S1 – prva subpopulacija spermija; S2 - druga subpopulacija spermija; S3 - treća subpopulacija spermija

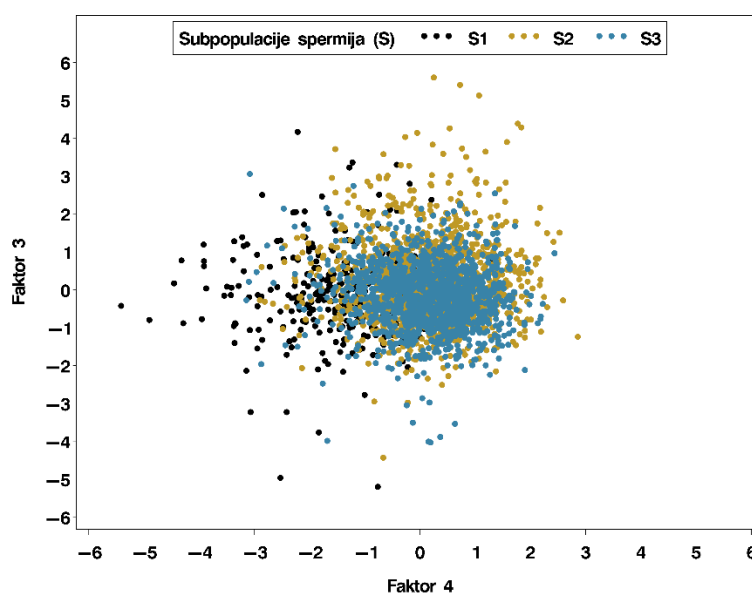
Eliptičnost = duljina / širina; Elongacija = [(duljina – širina) / (duljina + širina)]; Naboranost = $[4\pi \times \text{površina} / \text{opseg}^2]$; Pravilnost = $[\pi \times \text{duljina} \times \text{širina} / 4 \times \text{površina}]$

Na slici 5.2. vidi se najviše razlika između dviju najvećih subpopulacija S2 i S3 u odnosu na faktor 2 koji opisuje veličinu glave spermija jer između te dvije subpopulacije je najveća razlika upravo u veličini glave spermija. Na slici 5.3. vidi se razlika između

subpopulacije S1 i ostale dvije subpopulacije u odnosu na faktor 4 budući da je subpopulacija S1 imala najkraći rep spermija. Isto tako, vidi se da je subpopulacija S2 raspršenija u pozitivnom smjeru faktora 3 (veličina spojnog dijela spermija) od subpopulacije S3, budući da je imala veće vrijednosti duljine, opsega i površine spojnog dijela spermija.



Slika 5.2. Distribucija subpopulacija spermija (S1, S2, S3) u odnosu na faktor 1 (izduljenost glave spermija) i faktor 2 (veličina glave spermija).



Slika 5.3. Distribucija subpopulacija spermija (S1, S2, S3) u odnosu na faktor 3 (veličina spojnog dijela spermija) i faktor 4 (duljina repa spermija i širina spojnog dijela spermija spermija).

5.4. ODABIR VARIJABLI PRILIKOM MULTIVARIJANTNE LINEARNE REGRESIJSKE ANALIZE I MULTIVARIJANTNE ANALIZE VARIJANCE (MANOVA)

Budući da je analiza rađena pomoću nekoliko modela, za svaki model bilo je prvo potrebno ustvrditi koje morfometrijske varijable odabrati za svaki kinetički parametar zasebno (tablica 5.8.). Kod multivarijantne linearne regresijske analize (MRLA) to je rađeno pomoću prilagođenog koeficijenta determinacije (R^2), a kod multivarijantne analize varijance (MAV) to je rađeno pomoću postepenog odabira (stepwise selection). Kod potonje analize bilo je potrebno grupirati svaki kinetički pokazatelj. To je najčešće rađeno tako da bi se izračunala srednja vrijednost pokazatelja te se od te vrijednosti napravila podjela na grupu s većim i grupu s manjim vrijednostima. Ponekad su se podjele grupa (pokazatelji progresivnosti gibanja – LIN, STR i WOB) zbog specifičnosti analize radile prema određenim formulama nađenim u literaturi tako da se koristilo nekoliko kinetičkih pokazatelja zajedno. Kod MRLA osim pojedinih morfometrijskih varijabli, uključivale su se i glavne komponente odnosno faktori sačinjeni od najvažnijih morfometrijskih pokazatelja za svaki faktor (F1 – F5). Vrijednosti u tablici koje su podebljane pokazuju zajedničke varijable uključene u oba modela. U tablici 9. prikazano je koji morfometrijski pokazatelji su najčešće bili uključivani u analizu za sve kinetičke parametre. Multivarijantna linearna regresijska analiza imala je određene pokazatelje uključene u analizu više puta te ih ukupno ima 48 dok MAV ima ukupno 38 varijabli. Najvažniji morfometrijski pokazatelji odnosno parametri koji su najviše puta uključivani u analizu kod MRLA su duljina glave (7 puta), elongacija glave i opseg spojnog dijela (6 puta). Najvažniji morfometrijski pokazatelji uključivani u analizu kod MAV su duljina glave (6 puta) i duljina repa (5 puta). Najviše puta u obje analize bila je uključena duljina glave spermija (13 puta), a najmanje širina glave spermija (1 put).

Tablica 5.8. Odabir varijabli u modele multivarijantne linearne regresijske analize i multivarijantne analize varijance

	MULTIVARIJANTNA ANALIZA ODABIR VARIJABLI I ISPRAVNOG MODELA			
	PROC REG Selection = ADJR SQ (prilagođen koeficijent determinacije)	PROC GLMSELECT Selection = STEPWISE (modifikacija "FORWARD" odabira)	PROC REG Selection = ADJR SQ (prilagođen koeficijent determinacije)	PROC GLMSELECT Selection = STEPWISE (modifikacija "FORWARD" odabira)
Zavisna varijabla	VCL	VCL GRUPA GRUPA 1 - VCL => 93 GRUPA 2 - VCL < 93	STR	STR GRUPA GRUPA 1 - VAP-VSL < 1/3 VSL GRUPA 2 - VAP-VSL => 1/3 VSL
Odabrane nezavisne varijable morfometrije spermatozoa	duljina glave, površina glave, elongacija glave, pravilnost glave, površina spojnog dijela, F2	duljina glave, duljina spojnog dijela, površina spojnog dijela, duljina repa	opseg glave, eliptičnost glave, pravilnost glave, opseg spojnog dijela, F2, F3, F4, F5	duljina glave, opseg glave, naboranost glave, širina spojnog dijela, opseg spojnog dijela
Zavisna varijabla	VSL	VSL GRUPA GRUPA 1 - VSL => 50 GRUPA 2 - VSL < 50	WOB	WOB GRUPA GRUPA 1 - VCL => 93 WOB => 71 GRUPA 2 - VCL < 93 WOB => 71
Odabrane nezavisne varijable morfometrije spermatozoa	duljina glave, opseg glave, elongacija glave, širina spojnog dijela, opseg spojnog dijela, F2, F3	eliptičnost glave, naboranost glave, pravilnost glave, duljina repa	duljina glave, površina glave, naboranost glave, elongacija glave, duljina spojnog dijela, širina spojnog dijela, površina spojnog dijela, duljina repa, F2, F3	duljina glave, površina glave, opseg glave, eliptičnost glave, pravilnost glave, duljina spojnog dijela, površina spojnog dijela, duljina repa
Zavisna varijabla	VAP	VAP GRUPA GRUPA 1 - VAP => 67 GRUPA 2 - VAP < 67	ALH	ALH GRUPA GRUPA 1 - ALH => 3.1 GRUPA 2 - ALH < 3.1
Odabrane nezavisne varijable morfometrije spermatozoa	duljina glave, naboranost glave, elongacija glave, širina spojnog dijela, opseg spojnog dijela, F2, F3, F5	duljina glave, duljina spojnog dijela, površina spojnog dijela, duljina repa	duljina glave, širina glave, površina glave, opseg glave, eliptičnost glave, naboranost glave, duljina spojnog dijela, površina spojnog dijela, opseg spojnog dijela, duljina repa F2, F4	duljina glave, naboranost glave, pravilnost glave, širina spojnog dijela, površina spojnog dijela
Zavisna varijabla	LIN	LIN GRUPA GRUPA 1 - VCL => 93 LIN => 60 GRUPA 2 - VCL = > 93 LIN < 60	BCF	BCF GRUPA GRUPA 1 - BCF => 9.7 GRUPA 2 - BCF < 9.7
Odabrane nezavisne varijable morfometrije spermatozoa	duljina glave, opseg glave, elongacija glave, širina spojnog dijela, opseg spojnog dijela, F2, F3	duljina glave, širina glave, eliptičnost glave, naboranost glave, duljina spojnog dijela	duljina glave, površina glave, naboranost glave, elongacija glave, širina spojnog dijela, opseg spojnog dijela, F2, F3, F4	površina glave, površina spojnog dijela, opseg spojnog dijela, duljina repa

Eliptičnost = duljina / širina; Elongacija = $[(\text{duljina} - \text{širina}) / (\text{duljina} + \text{širina})]$; Naboranost = $[4\pi \times \text{površina} / \text{opseg}^2]$; Pravilnost = $[\pi \times \text{duljina} \times \text{širina} / 4 \times \text{površina}]$

F1 – Faktor 1 (Faktor izduljenosti glave spermija); F2 – Faktor 2 (Faktor veličine glave spermija); F3 – Faktor 3 (Faktor veličine spojnog dijela spermija); F4 – Faktor 4 (Faktor širine spojnog dijela i duljine repa spermija); F5 – Faktor 5 (Faktor pravilnosti glave spermija) Podebljane vrijednosti pokazuju zajedničke varijable u oba modela

Tablica 5.9. Uključenost varijabli u modele multivarijantne linearne regresijske analize i multivarijantne analize varijance za sve kinetičke pokazatelje

BROJ PONAVLJANJA VARIJABLI U ANALIZAMA ZA SVE KINETIČKE POKAZATELJE		POKAZATELJI GLAVE SPERMIJA								POKAZATELJI SPOJNOG DIJELA SPERMIJA				REP	UKUPNO
		DULJINA	ŠIRINA	POVRŠINA	OPSEG	ELIPTIČNOST T	ELONGACIJA A	PRAVILNOST T	NABORANOST ST	DULJINA	ŠIRINA	POVRŠINA	OPSEG	DULJINA	
ANALIZA	MULTIVARIJANTNA REGRESIJSKA ANALIZA	7	1	4	4	2	6	2	4	2	5	3	6	2	48
	GENERALNI LINEARNI MODEL - MULTIVARIJANTNA ANALIZA	6	0	2	4	2	0	3	4	4	2	4	2	5	38
UKUPNO		13	1	6	8	4	6	5	8	6	7	7	8	7	86

5.5. MULTIVARIJANTNA LINEARNA REGRESIJSKA ANALIZA MORFOMETRIJSKIH POKAZATELJA SPERMIJA ZA SVAKI KINETIČKI POKAZATELJ

U tablici 5.10. i 5.11. prikazani su rezultati multivarijantne linearne regresijske analize zavisnih kinetičkih pokazatelja spermija s nezavisnim morfometrijskim pokazateljima spermija i glavnim komponentama ili faktorima. Osim ukupne značajnosti modela te pojedinačne statističke značajnosti testirao se i faktor inflacije varijance (VIF). Faktor inflacije varijance koristi se za dokazivanje da regresori međusobno ne koreliraju. Ako je $VIF > 10$, postoji kolinearnost te se u tom slučaju rezultati ne mogu prihvatiti iako su statistički značajni. Ako je $VIF < 10$, tada nema kolinearnosti. Za svaki parametar procenjen je standardizirani beta koeficijent (β) koji je uzet u obzir samo u slučaju statističke značajnosti ($p < 0,05$) te faktoru inflacije varijance < 10 (podebljane vrijednosti u tablici). Standardizirani beta koeficijent uspoređuje snagu učinka svake pojedinačne nezavisne varijable sa zavisnom varijablom. Što je veća apsolutna vrijednost beta koeficijenta, to je učinak jači. U tablici 10. vidljivo je da prethodno navedene uvjete zadovoljava nekoliko pokazatelja. Prosječna brzina spermija na njegovoj pravolinijskoj putanji pravocrtnost putanje spermija (VSL) i prosječna brzina spermija na njegovoj prosječnoj putanji (VAP) u odnosu na širinu spojnog dijela spermija, pravocrtnost putanje spermija (STR) u odnosu na eliptičnost glave spermija te stupanj oscilacije stvarne putanje spermija u odnosu na prosječnu putanju spermija (WOB) prema duljini repa spermija. Tako prema standardiziranom beta koeficijentu svaki porast u jednoj standardnoj devijaciji (std) širine spojnog dijela spermija uzrokuje pad za 0,78 std kod VSL i 0,9 std kod VAP. Svaki porast od jedne std eliptičnosti glave uzrokuje porast od jedne std kod VSL. Svaki porast od jedne std duljine repa uzrokuje pad od 0,7 std kod WOB. U tablici 11. vidljivo je da samo pravocrtnost putanje spermija (STR) u odnosu na faktor 4 zadovoljava uvjete statističke značajnosti ($p < 0,05$) i faktora inflacije varijance < 10 . Tako za svaki porast od jedne std faktora 4 (faktor širine spojnog dijela i duljine repa spermija) postoji porast od 1,2 std kod STR.

Tablica 5.10. Multivarijantna linearna regresijska analiza zavisnih kinetičkih pokazatelja i nezavisnih morfometrijskih pokazatelja spermija jarčeva pasmine francuska alpina

Kinetički pokazatelji spermija	Morfometrijski pokazatelji		Pokazatelji oblika glave spermija				Pokazatelji veličine glave spermija				Pokazatelji veličine spojnog dijela spermija				Rep spermija
	R^2 (R^{2**}) Ukupna značajnost modela		Eliptičnost	Elongacija	Naboranost	Pravilnost	Duljina (μm)	Širina (μm)	Površina (μm^2)	Opseg (μm)	Duljina (μm)	Širina (μm)	Površina (μm^2)	Opseg (μm)	Duljina (μm)
VCL ($\mu\text{m/s}$)	0,51 (0,39) 0,006	p	0,0012			0,0008	0,001						0,20		
		β	19,8			8,5	-27,2						0,45		
		VIF	1373			231	2492						5,7		
VSL ($\mu\text{m/s}$)	0,56 (0,42) 0,005	p	<0,0001				<0,0001			<0,0001		0,02		0,04	
		β	16,6				-20,7			-8,72		-0,78		1,31	
		VIF	616				931			156,9		5,4		19,5	
VAP ($\mu\text{m/s}$)	0,56 (0,39) 0,01	p	0,0003	0,0003			0,0003					0,01		0,13	
		β	20,0	6,0			-25,5					-0,9		1,0	
		VIF	1061	93,8			1670					6,5		22,4	
LIN (%)	0,49 (0,32) 0,02	p	0,0005				0,0004			0,0003		0,06		0,02	
		β	15,4				-19,2			-8,0		-0,71		1,68	
		VIF	616				931			156		5,46		19,5	
STR (%)	0,55 (0,38) 0,01	p	0,01			0,004				0,003				0,02	
		β	1,0			-10,7				-8,9				1,7	
		VIF	7,3			529				153				25	
WOB (%)	0,58 (0,36) 0,03	p	0,0004	0,0003			0,0003		0,0007		0,06	0,007	0,02		0,03
		β	27,4	8,0			-32,0		-12,6		-2,9	-2,7	-3,5		-0,7
		VIF	1826	155			2396		440		96	37	94		4,8
ALH (μm)	0,56 (0,25) 0,1	p	0,2	0,02			0,01	0,06	0,03	0,06	0,007		0,003	0,1	0,009
		β	6,9	17,3			-12,6	-13,4	-26,9	20,2	-4,6		-4,6	-1,9	-2,3
		VIF	1165	2051			904	1771	4998	4268	89,5		68,8	50,7	25,5
BCF (Hz)	0,42 (0,15) 0,1	p	0,01	0,01			0,01		0,02			0,06		0,1	
		β	-13,7	-5,2			17,3		8,5			1,5		-1,3	
		VIF	977	133			1486		407			21,9		27,3	

p - Statistička značajnost; β - Procjena standardnog koeficijenta; VIF - Faktor inflacije varijance; ** Prilagođeni koeficijent determinacije (R^2)

VCL – prosječna brzina spermija na njegovoj krivolinijskoj putanji; VSL - prosječna brzina spermija na njegovoj pravolinijskoj putanji; VAP - prosječna brzina spermija na njegovoj prosječnoj putanji; LIN - linearnost krivolinijske putanje spermija (VSL/VCL); STR - pravocrtost putanje spermija (VSL/VAP); WOB - stupanj oscilacije stvarne putanje spermija u odnosu na prosječnu putanju spermija (VAP/VCL); ALH - lateralni otklon glave u odnosu na prosječnu putanju spermija; BCF - prosječan broj prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje spermija

Tablica 5.11. Multivarijantna linearna regresijska analiza zavisnih kinetičkih pokazatelja i nezavisnih glavnih komponenata ili faktora spermija jarčeva pasmine francuska alpina

Kinetički pokazatelji spermija	Morfometrijski pokazatelji	FAKTORI				
	R ² (R ² **) Ukupna značajnost modela	1	2	3	4	5
VCL (µm/s)	0,51 (0,39) 0,006	<i>p</i>	0,11			
		β	-1,3			
		VIF	31,7			
VSL (µm/s)	0,56 (0,42) 0,005	<i>p</i>	<0,0001	0,0001		
		β	25,8	-9,5		
		VIF	1431	206		
VAP (µm/s)	0,56 (0,39) 0,01	<i>p</i>	0,0003	0,0006	0,0008	
		β	22,9	-8,3	3,14	
		VIF	1357	207	30,4	
LIN (%)	0,49 (0,32) 0,02	<i>p</i>	0,0004	0,0004		
		β	23,9	-9,1		
		VIF	1431	206		
STR (%)	0,55 (0,38) 0,01	<i>p</i>	0,003	0,009	0,004	0,005
		β	13,2	-5,1	1,2	10,0
		VIF	745	147	7,1	484
WOB (%)	0,58 (0,36) 0,03	<i>p</i>	0,0004	0,004		
		β	44,4	-7,9		
		VIF	4933	267		
ALH (µm)	0,56 (0,25) 0,1	<i>p</i>	0,002		0,008	
		β	32,9		3,7	
		VIF	3468		63,0	
BCF (Hz)	0,42 (0,15) 0,1	<i>p</i>	0,01	0,01	0,1	
		β	-22,6	8,7	0,9	
		VIF	2567	390	9,8	

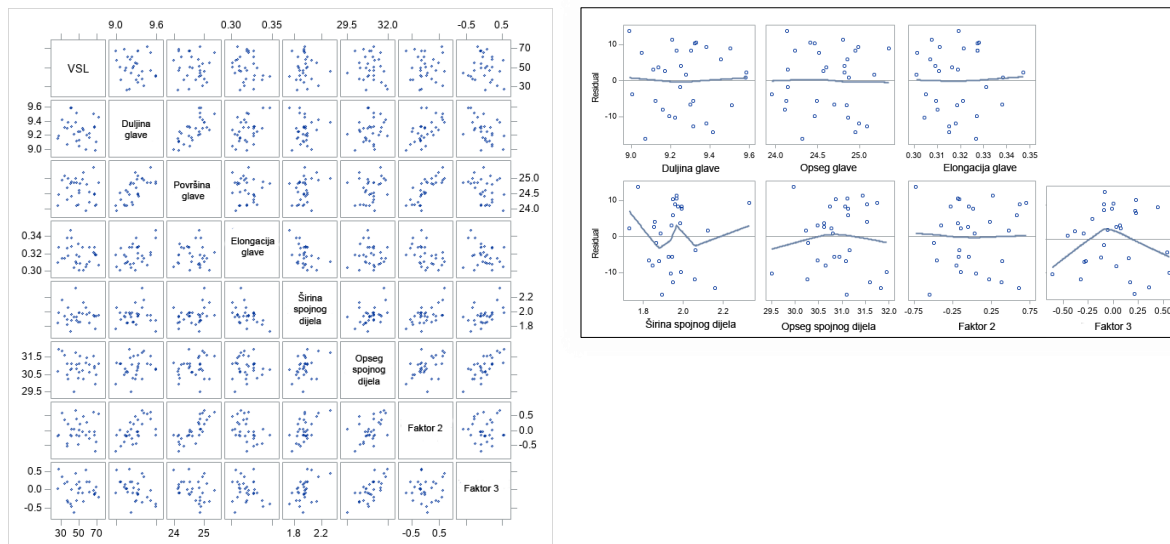
p - Statistička značajnost; β - Procjena standardnog koeficijenta; VIF - Faktor inflacije varijance; ** Prilagođeni koeficijent determinacije (R²)

F1 – Faktor 1 (Faktor izduljenosti glave spermija); F2 - Faktor 2 (Faktor veličine glave spermija); F3 - Faktor 3 (Faktor veličine spojnog dijela spermija); F4 - Faktor 4 (Faktor širine spojnog dijela i duljine repa spermija); F5 - Faktor 5 (Faktor pravilnosti glave spermija)

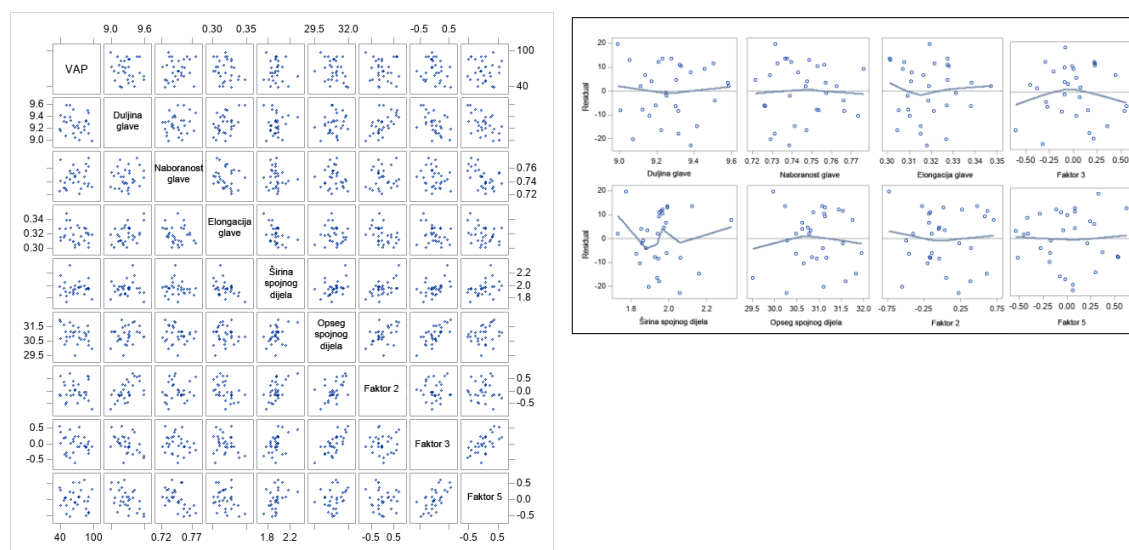
Podobljane vrijednosti pokazuju zajedničke varijable u oba modela

VCL – prosječna brzina spermija na njegovoj krivolinijskoj putanji; VSL - prosječna brzina spermija na njegovoj pravolinijskoj putanji; VAP - prosječna brzina spermija na njegovoj prosječnoj putanji; LIN - linearnost krivolinijske putanje spermija (VSL/VCL); STR - pravocrtnost putanje spermija (VSL/VAP); WOB - stupanj oscilacije stvarne putanje spermija u odnosu na prosječnu putanju spermija (VAP/VCL); ALH - lateralni otklon glave u odnosu na prosječnu putanju spermija; BCF - prosječan broj prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje spermija

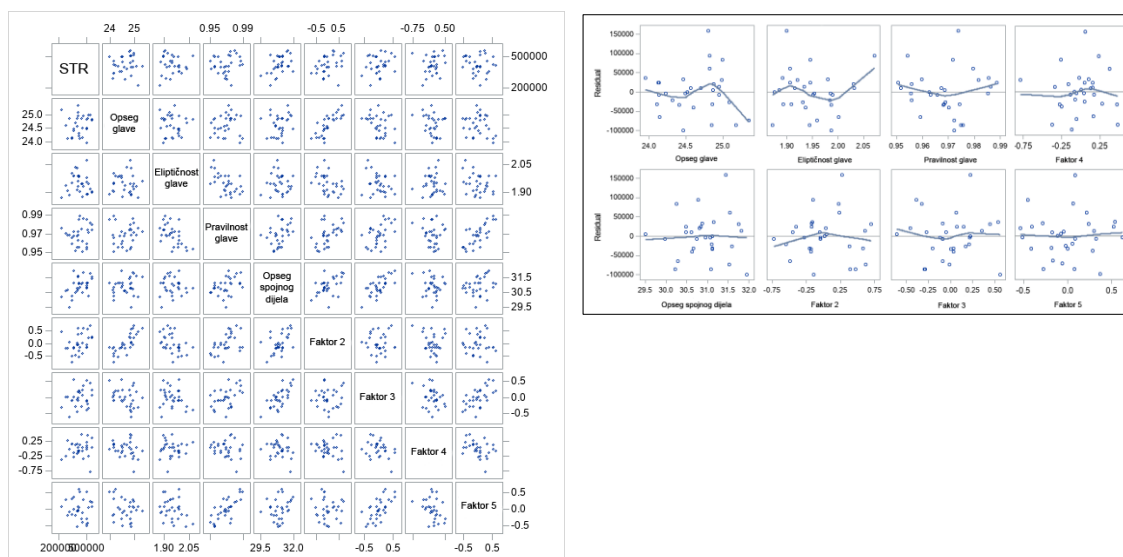
Na slikama 5.4., 5.5, 5.6. i 5.7. prikazane su korelacije kinetičkih pokazatelja koji ispunjavaju uvjete statističke značajnosti i $VIF < 10$ te reziduali prema regresorima za srednje vrijednosti kinetičkih parametara s LOESS zaglađivanjem



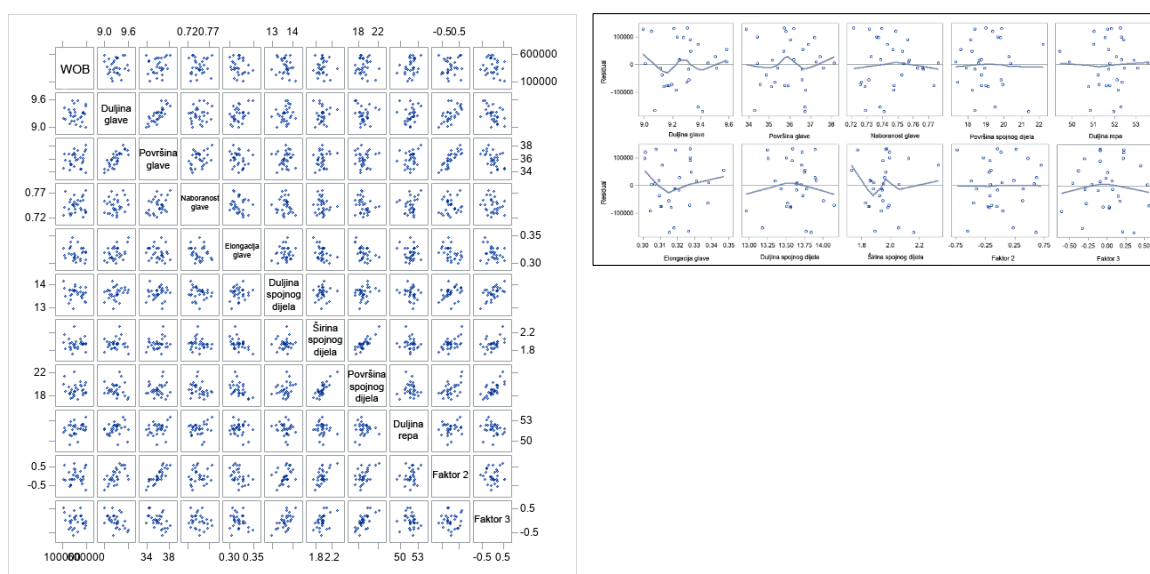
Slika 5.4. Korelacije prosječne brzine spermija na njegovoj pravolinijskoj putanji (VSL) s pokazateljima morfometrije spermija koji su uključeni u analizu i reziduali prema regresorima



Slika 5.5. Korelacije prosječne brzine spermija na njegovoj prosječnoj putanji (VAP) s pokazateljima morfometrije spermija koji su uključeni u analizu i reziduali prema regresorima



Slika 5.6. Korelacije pravocrtnosti putanje spermija (STR) s pokazateljima morfometrije spermija koji su uključeni u analizu i reziduali prema regresorima



Slika 5.7. Korelacije stupnja oscilacije stvarne putanje spermija u odnosu na prosječnu putanju spermija (WOB) s pokazateljima morfometrije spermija koji su uključeni u analizu i reziduali prema regresorima

5.6. MULTIVARIJANTNA ANALIZA VARIJANCE MORFOMETRIJSKIH POKAZATELJA SPERMIJA ZA SVAKI KINETIČKI POKAZATELJ

U tablici 5.12. prikazana je multivarijantna analiza varijance kinetičkih pokazatelja s morfometrijskim pokazateljima spermija. Kinetički pokazatelji su kod ove analize grupirani u skupine. To je najčešće rađeno tako da bi se izračunala srednja vrijednost parametra te se od te vrijednosti napravila podjela na grupu s većim i grupu s manjim vrijednostima. Ponekad su se podjele grupa (pokazatelji progresivnosti gibanja – LIN, STR i WOB) zbog specifičnosti analize radile prema određenim formulama nađenim u literaturi tako da se koristilo nekoliko kinetičkih pokazatelja zajedno. Tako su spermiji veće prosječne brzine spermija na njegovoj krivolinijskoj putanji ($VCL \geq 93$; grupa 1) imali statistički značajno manju duljinu glave ($9,21 \mu\text{m}$ vs $9,28 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$) i spojnog dijela spermija ($13,43 \mu\text{m}$ vs $13,65 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$), a veću duljinu repa ($49,94 \mu\text{m}$ vs $49,46 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$). Spermiji veće prosječne brzine spermija na njegovoj pravolinijskoj putanji ($VSL \geq 50$; grupa 1) imali su statistički značajno manju eliptičnost glave ($1,921$ vs $1,955$; $p < 0,0001$) i dulji rep spermija ($49,80 \mu\text{m}$ vs $49,59 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$). Spermiji veće prosječne brzine spermija na njegovoj prosječnoj putanji ($VAP \geq 67$; grupa 1) imali su kraću glavu ($9,21 \mu\text{m}$ vs $9,28 \mu\text{m}$; $p = 0,0002$) i spojni dio repa ($13,47 \mu\text{m}$ vs $13,61 \mu\text{m}$; $p = 0,0001$), a veću površinu ($19,09 \mu\text{m}^2$ vs $18,89 \mu\text{m}^2$; $p = 0,02$) i duljinu repa spermija ($49,90 \mu\text{m}$ vs $49,50 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$). Spermiji veće linearnosti krivolinijske putanje spermija uz konstantnu veću prosječnu brzinu spermija na njegovoj krivolinijskoj putanji odnosno gibljivi spermiji veće progresivnost ($VCL \geq 93$ LIN ≥ 60 ; grupa 1) imali su veću naboranost ($0,757$ vs $0,741$; $p < 0,0001$) i duljinu glave ($9,24 \mu\text{m}$ vs $9,18 \mu\text{m}$; $p = 0,05$) te duljinu spojnog dijela tijela ($13,55 \mu\text{m}$ vs $13,30 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$). Spermiji bolje pravocrtnosti putanje spermija ($VAP - VSL < 1/3 VSL$; grupa 1) imali su veću naboranost ($0,755$ vs $0,747$; $p < 0,0001$) i duljinu glave ($9,24 \mu\text{m}$ vs $9,18 \mu\text{m}$; $p = 0,006$) te veću širinu ($2,01 \mu\text{m}$ vs $1,96 \mu\text{m}$; $p = 0,01$) i opseg spojnog dijela spermija ($30,84 \mu\text{m}$ vs $30,19 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$). Spermiji veće prosječne brzine spermija na njegovoj krivolinijskoj putanji uz konstantan stupanj oscilacije stvarne putanje spermija u odnosu na prosječnu putanju spermija ($VCL \geq 93$; WOB ≥ 71 ; grupa 1) imali su manju eliptičnost glave ($1,928$ vs $1,952$; $p = 0,02$), veću pravilnost glave ($0,969$ vs $0,962$; $p = 0,005$), manju duljinu ($9,23 \mu\text{m}$ vs $9,29 \mu\text{m}$; $p = 0,02$), površinu ($35,97 \mu\text{m}^2$ vs $36,29 \mu\text{m}^2$; $p = 0,03$) i opseg glave ($24,54 \mu\text{m}$ vs $24,81 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$) te manje duljine spojnog dijela ($13,50 \mu\text{m}$ vs $13,67 \mu\text{m}$; $p = 0,003$), a veće površine spojnog dijela ($19,15 \mu\text{m}^2$ vs $18,79 \mu\text{m}^2$; $p = 0,007$) i duljine repa spermija ($49,87 \mu\text{m}$ vs $49,49 \mu\text{m}$; $p = 0,01$). Spermiji većeg lateralnog odklona glave u odnosu na prosječnu putanju spermija ($ALH \geq 3,1$; grupa 1) imali su bolju pravilnost glave ($0,971$ vs $0,965$; $p = 0,0002$), kraću duljinu glave ($9,22 \mu\text{m}$ vs $9,28 \mu\text{m}$; $p = 0,0009$) i veću površinu spojnog

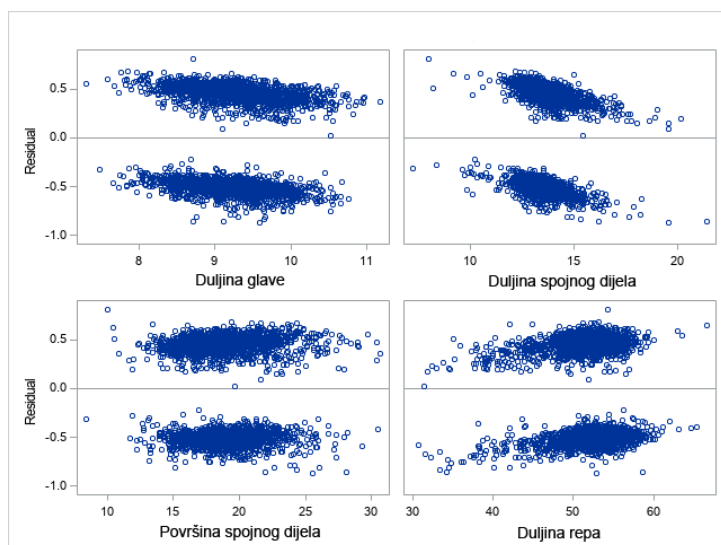
dijela spermija ($19,05 \mu\text{m}^2$ vs $18,86 \mu\text{m}^2$; $p=0,02$). Spermiji većeg prosječnog broja prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje spermija ($\text{BCF} \geq 9,7$; grupa 1) imali su manju površinu glave spermija ($35,77 \mu\text{m}^2$ vs $36,19 \mu\text{m}^2$; $p<0,0001$), veću duljinu ($13,62 \mu\text{m}$ vs $13,46 \mu\text{m}$; $p<0,0001$) i površinu spojnog dijela ($19,18 \mu\text{m}^2$ vs $18,76 \mu\text{m}^2$; $p<0,0001$) te manju duljinu repa spermija ($49,51 \mu\text{m}$ vs $49,89 \mu\text{m}$; $p<0,0001$).

Tablica 5.12. Multivarijantna analiza varijance (MANOVA) svakog pojedinog kinetičkog pokazatelja spermija s morfometrijskim pokazateljima spermija jarčeva pasmina francuska alpina

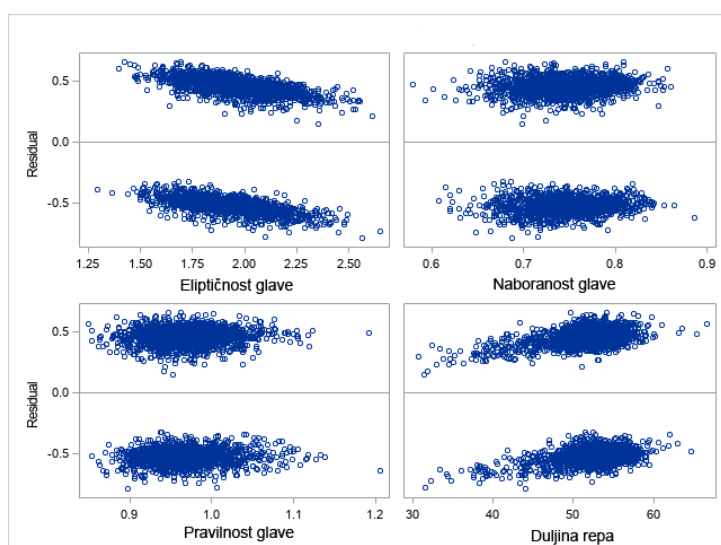
Kinetički pokazatelj spermija	Morfometrijski pokazatelji		Pokazatelji oblika glave spermija				Pokazatelji veličine glave spermija				Pokazatelji veličine spojnog dijela spermija				Rep spermija
	Ukupna značajnost modela (Wilks' Lambda)	Grupa Statistička Značajnost	Elipičnost	Elongacija	Naboranost	Pravilnost	Duljina (μm)	Širina (μm)	Površina (μm ²)	Opseg (μm)	Duljina (μm)	Širina (μm)	Površina (μm ²)	Opseg (μm)	Duljina (μm)
VCL (μm/s)	<0,0001	1 - VCL=>93					9,21±0,01				13,43±0,03		19,04±0,07		49,94±0,07
		2 - VCL<93					9,28±0,01				13,65±0,02		18,93±0,06		49,46±0,07
		p					<0,0001				<0,0001		0,2		<0,0001
VSL (μm/s)	<0,0001	1 - VSL=>50	1,921±0,005		0,748±0,001	0,968±0,001									49,80±0,07
		2 - VSL<50	1,955±0,005		0,746±0,001	0,967±0,001									49,59±0,07
		p	<0,0001		0,2	0,7									0,02
VAP (μm/s)	<0,0001	1 - VAP=>67					9,21±0,01				13,47±0,03		19,09±0,07		49,90±0,07
		2 - VAP<67					9,28±0,01				13,61±0,02		18,89±0,06		49,50±0,07
		p					0,0002				0,0001		0,02		<0,0001
LIN (%)	<0,0001	1 - VCL=>93 LIN=> 60	1,922±0,007		0,757±0,001		9,24±0,02	4,82±0,01			13,55±0,04				
		2 - VCL=>93 LIN<60	1,927±0,007		0,741±0,001		9,18±0,01	4,80±0,01			13,30±0,03				
		p	0,6		<0,0001		0,05	0,1			<0,0001				
STR (%)	<0,0001	1 - VAP- VSL<1/3 VSL			0,755±0,001		9,24±0,01			24,54±0,03		2,01±0,01		30,84±0,06	
		2 - VAP- VSL=>1/3 VSL			0,747±0,001		9,18±0,02			24,56±0,04		1,96±0,01		30,19±0,05	
		p			<0,0001		0,006			0,7		0,01		<0,0001	
WOB (%)	<0,0001	1 - VCL=>93 WOB=>71	1,928±0,006			0,969±0,001	9,23±0,01		35,97±0,08	24,54±0,03	13,50±0,03		19,15±0,08		49,87±0,09
		2 - VCL<93 WOB=>71	1,952±0,009			0,962±0,002	9,29±0,02		36,29±0,12	24,81±0,05	13,67±0,05		18,79±0,12		49,49±0,13
		p	0,02			0,005	0,02		0,03	<0,0001	0,003		0,007		0,01
ALH (μm)	<0,0001	1 - ALH=>3.1			0,746±0,001	0,971±0,001	9,22±0,01					1,97±0,01	19,05±0,06		
		2 - ALH<3.1			0,748±0,001	0,965±0,001	9,28±0,01					1,99±0,01	18,86±0,06		
		p			0,1	0,0002	0,0009					0,1	0,02		
BCF (Hz)	<0,0001	1 - BCF=>9,7							35,77±0,06		13,62±0,02		19,18±0,06		49,51±0,07
		2 - BCF<9,7							36,19±0,07		13,46±0,03		18,76±0,06		49,89±0,07
		p							<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001

VCL – prosječna brzina spermija na njegovoj krivolinijskoj putanji; VSL - prosječna brzina spermija na njegovoj pravolinijskoj putanji; VAP - prosječna brzina spermija na njegovoj prosječnoj putanji; LIN - linearnost krivolinijske putanje spermija (VSL/VCL); STR - pravocrtost putanje spermija (VSL/VAP); WOB - stupanj oscilacije stvarne putanje spermija u odnosu na prosječnu putanju spermija (VAP/VCL); ALH - lateralni otklon glave u odnosu na prosječnu putanju spermija; BCF - prosječan broj prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje spermija

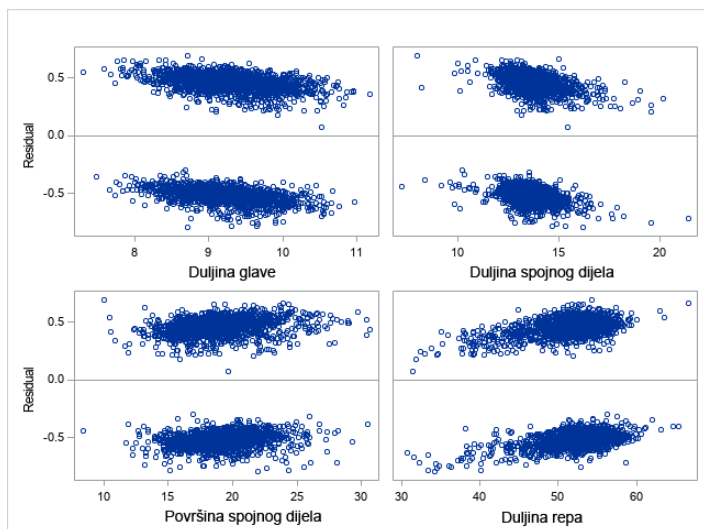
Na slikama 5.8., 5.9., 5.10., 5.11., 5.12., 5.13., 5.14. i 5.15. prikazani su grafikoni reziduala za svaki pojedinačni kinetički pokazatelj. Reziduali mogu pokazivati negativni nagib za pojedini morfometrijski pokazatelj što ukazuje da grupa kinetičkog pokazatelja s većom vrijednosti ima manje vrijednosti morfometrijskog pokazatelja i obratno kod pozitivnog nagiba. U slučaju kada nagib reziduala nije izražen tada morfometrijske vrijednosti nisu statistički značajno različite između grupa kinetičkog pokazatelja.



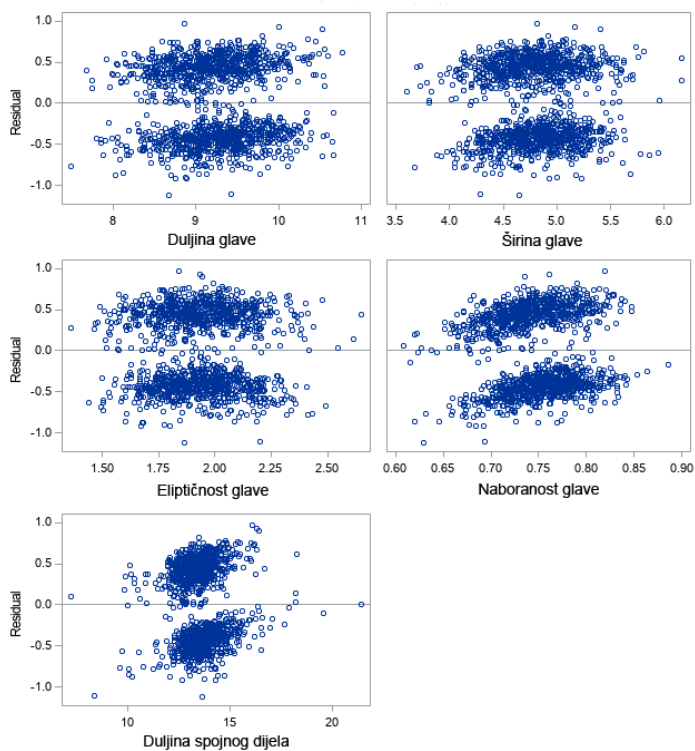
Slika 5.8. Grafikon reziduala za prosječnu brzinu spermija na njegovoj krivolinijskoj putanji (VCL) prema morfometrijskim pokazateljima spermija koji su odabrani za analizu.



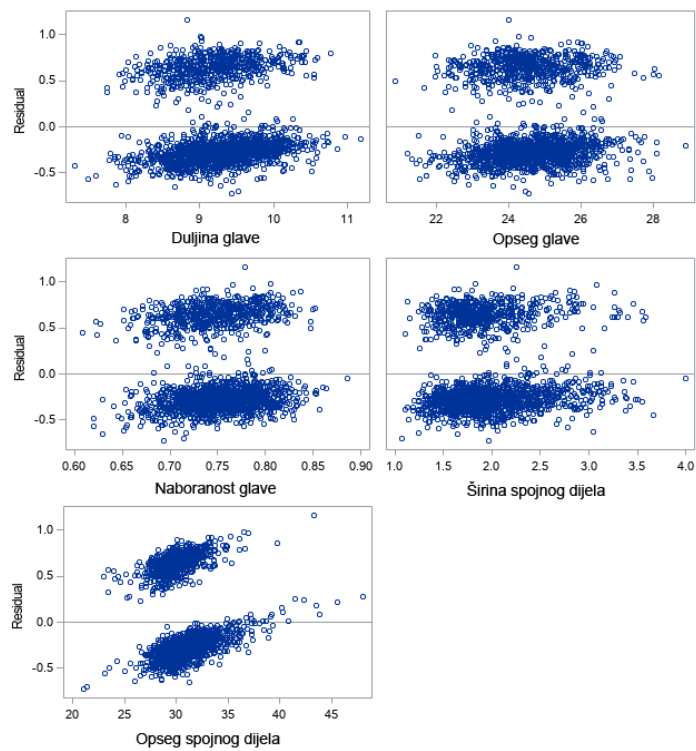
Slika 5.9. Grafikon reziduala za prosječnu brzinu spermija na njegovoj pravolinijskoj putanji (VSL) prema morfometrijskim pokazateljima spermija koji su odabrani za analizu.



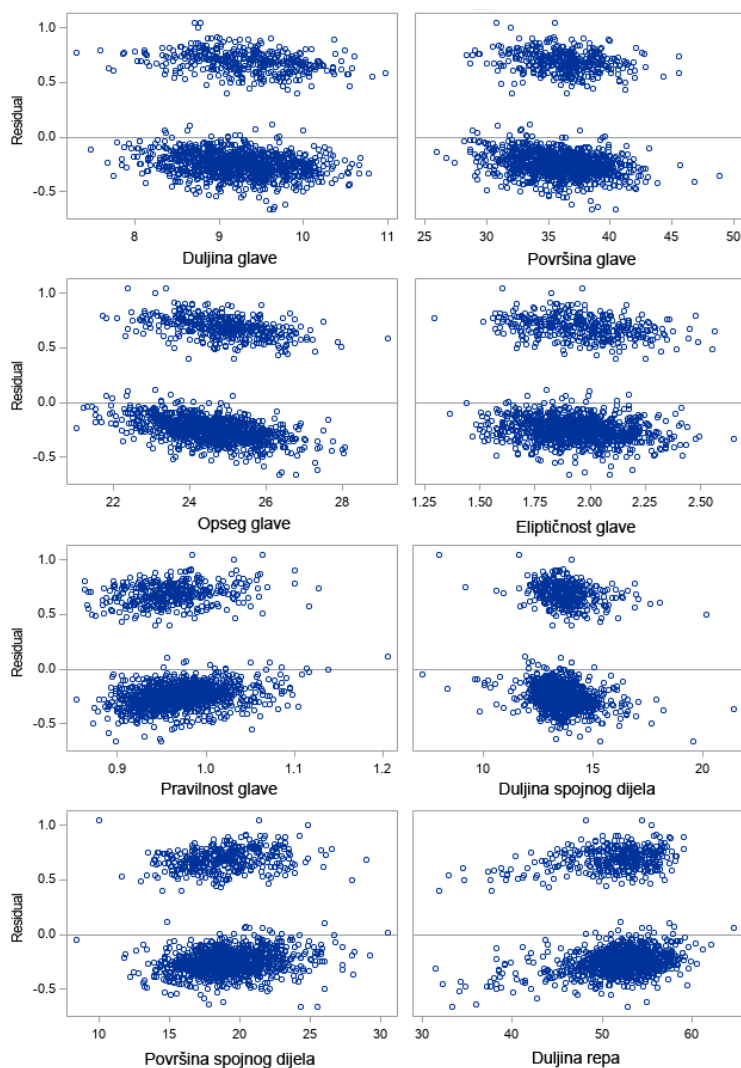
Slika 5.10. Grafikon reziduala za prosječnu brzinu spermija na njegovoj prosječnoj putanji (VAP) prema morfometrijskim pokazateljima spermija koji su odabrani za analizu.



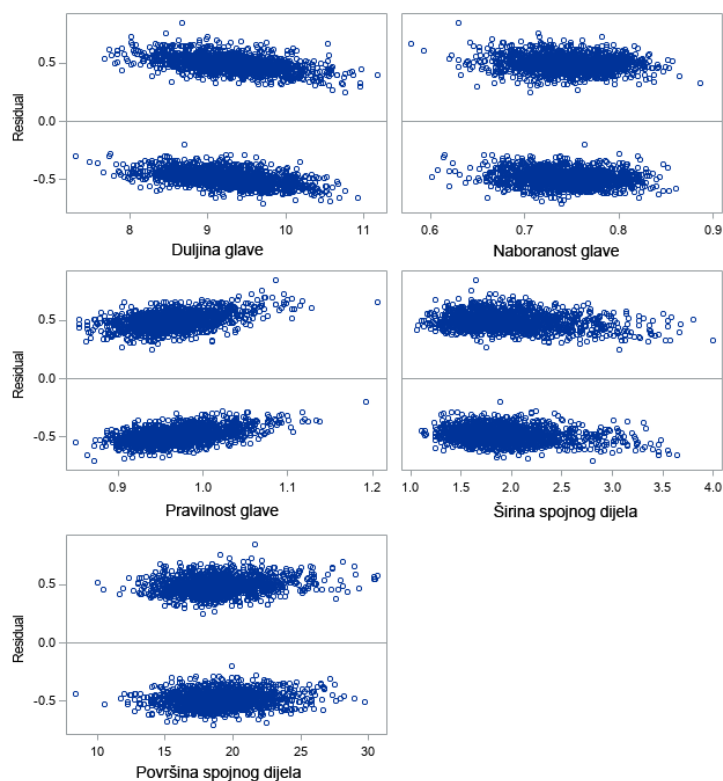
Slika 5.11. Grafikon reziduala za linearnost krivolinijske putanje spermija (LIN) prema morfometrijskim pokazateljima spermija koji su odabrani za analizu.



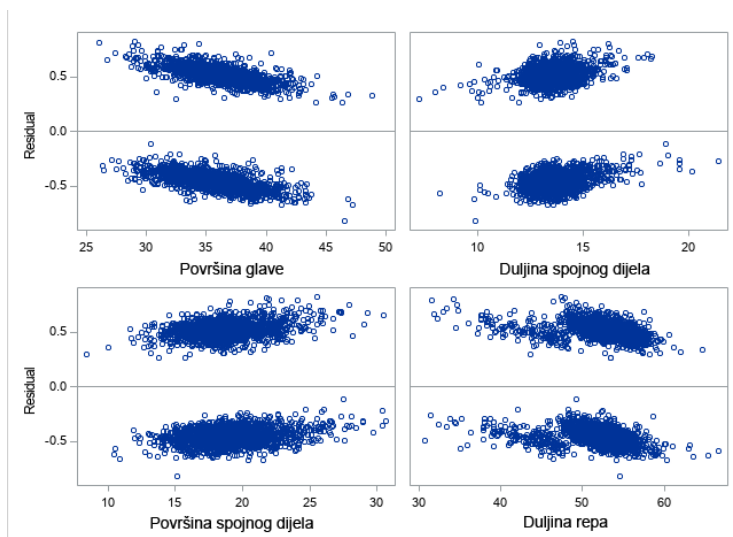
Slika 5.12. Grafikon reziduala za pravocrtnost putanje spermija (STR) prema morfometrijskim pokazateljima spermija koji su odabrani za analizu.



Slika 5.13. Grafikon reziduala za stupanj oscilacije stvarne putanje spermija u odnosu na prosječnu putanju spermija (WOB) prema morfometrijskim pokazateljima spermija koji su odabrani za analizu.



Slika 5.14. Grafikon reziduala za lateralni otklon glave (ALH) u odnosu na prosječnu putanju spermija prema morfometrijskim pokazateljima spermija koji su odabrani za analizu.

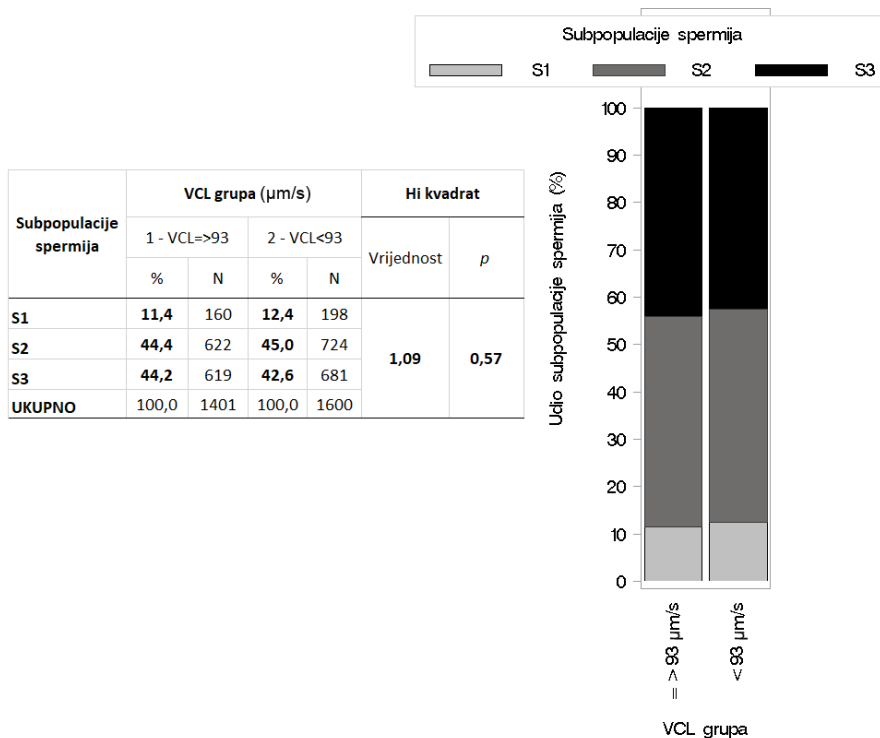


Slika 5.15. Grafikon reziduala za prosječan broj prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje spermija (BCF) prema morfometrijskim pokazateljima spermija koji su odabrani za analizu.

5.7. ANALIZA UDJELA SUBPOPULACIJA SPERMIJA UNUTAR GRUPIRANIH KINETIČKIH POKAZATELJA SPERMIJA

Prema ranije opisanoj analizi grupiranja (tablica 5.7.) dobivene su tri dobro definirane subpopulacije spermija (S1, S2 i S3). Prva subpopulacija spermija (S1) čini samo 11,9 % ukupne populacije te ju čine spermiji s najmanjom eliptičnošću, elongacijom i pravilnošću glave dok je rep spermija ove subpopulacije najkraći, ali s najjvećom širinom spojnog dijela spermija. Druga subpopulacija spermija (S2) čini 44,8 % ukupne populacije te ju čine najveći spermiji s najvećom eliptičnošću, elongacijom i pravilnosti glave. Spojni dio spermija ove subpopulacije ima najveću duljinu, površinu i opseg te imaju najduži rep. Treća subpopulacija spermija (S3) čini 43,3 % ukupne populacije te su to najmanji spermiji s nešto kraćim repom od S2 subpopulacije. Analizom udjela subpopulacija (hi-kvadrat test) prethodno napravljenih skupina svakog kinetičkog pokazatelja prikazane su eventualne razlike u distribuciji udjela pojedinih subpopulacija spermija između skupina.

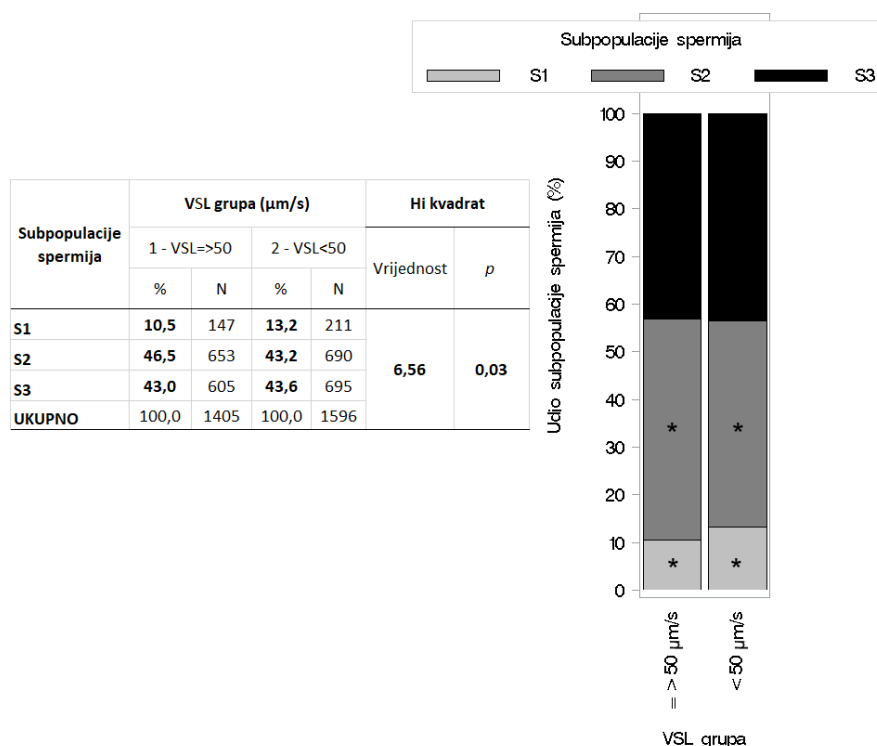
Između skupina veće i manje prosječne brzine spermija na njegovoj krivolinijskoj putanji ($VCL \geq 93$ - grupa 1; $VCL < 93$ – grupa 2) nije bilo statistički značajnih razlika u udjelima pojedinih subpopulacija spermija (slika 5.16.).



Slika 5.16. Udjeli subpopulacija spermija (S1 - spermiji s najmanjom eliptičnošću, elongacijom i pravilnošću glave, najkraćim repom i najvećom širinom spojnog dijela; S2 - najveći spermiji

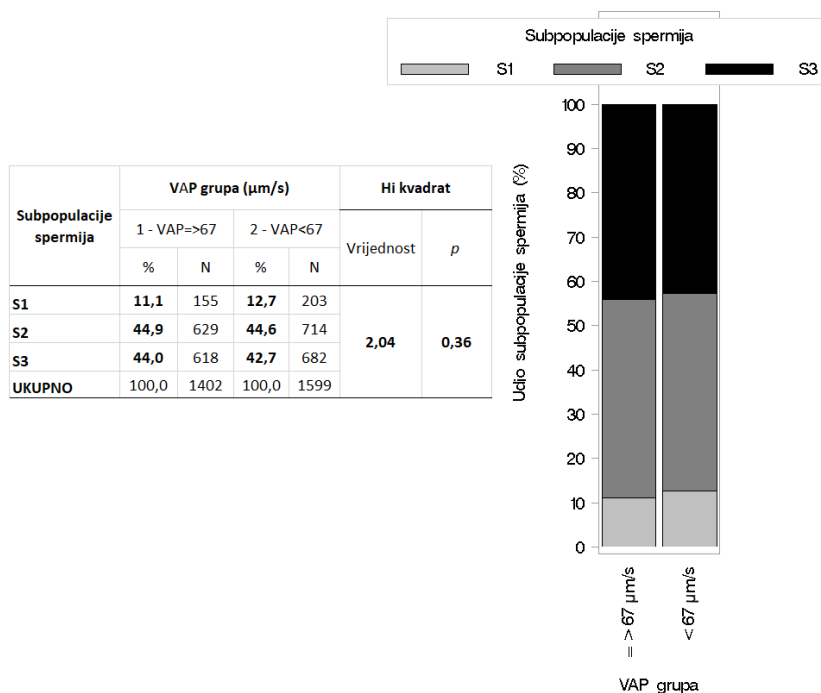
s najvećom glavom, spojnim dijelom i najduljim repom te najboljom eliptičnosti, elongacijom i pravilnosti glave; S3 - najmanji spermiji) grupirani prema prosječnoj brzini spermija na njegovoj krivolinijskoj putanji ($VCL \geq 93$ - grupa 1; $VCL < 93$ – grupa 2)

Spermiji veće prosječne brzine spermija na njegovoj pravolinijskoj putanji ($VSL \geq 50$; grupa 1) imali su statistički značajno ($p=0,03$) manji udio S1 subpopulacije (10,5 % vs 13,2 %) te veći udio S2 subpopulacije spermija (46,5 % vs 43,2 %) od spermija manje prosječne brzine na pravolinijskoj putanji ($VSL < 50$; grupa 2) (slika 5.17.).



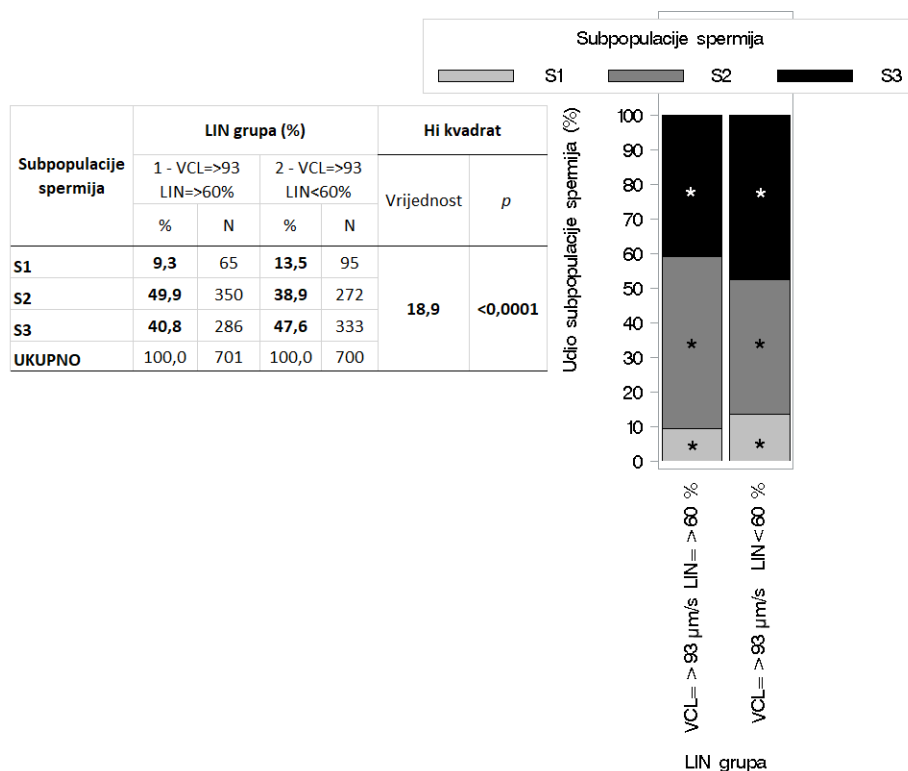
Slika 5.17. Udjeli subpopulacija spermija (S1 - spermiji s najmanjom eliptičnošću, elongacijom i pravilnošću glave, najkraćim repom i najvećom širinom spojnog dijela; S2 - najveći spermiji s najvećom glavom, spojnim dijelom i najduljim repom te najboljom eliptičnosti, elongacijom i pravilnosti glave; S3 - najmanji spermiji) grupirani prema prosječnoj brzini spermija na njegovoj pravolinijskoj putanji ($VSL \geq 50$ - grupa 1; $VSL < 50$ – grupa 2)

Između skupina veće i manje prosječne brzine spermija na njegovoj prosječnoj putanji ($VAP \geq 67$ - grupa 1; $VAP < 67$ – grupa 2) nije bilo statistički značajnih razlika u udjelima pojedinih subpopulacija spermija (slika 5.18.).



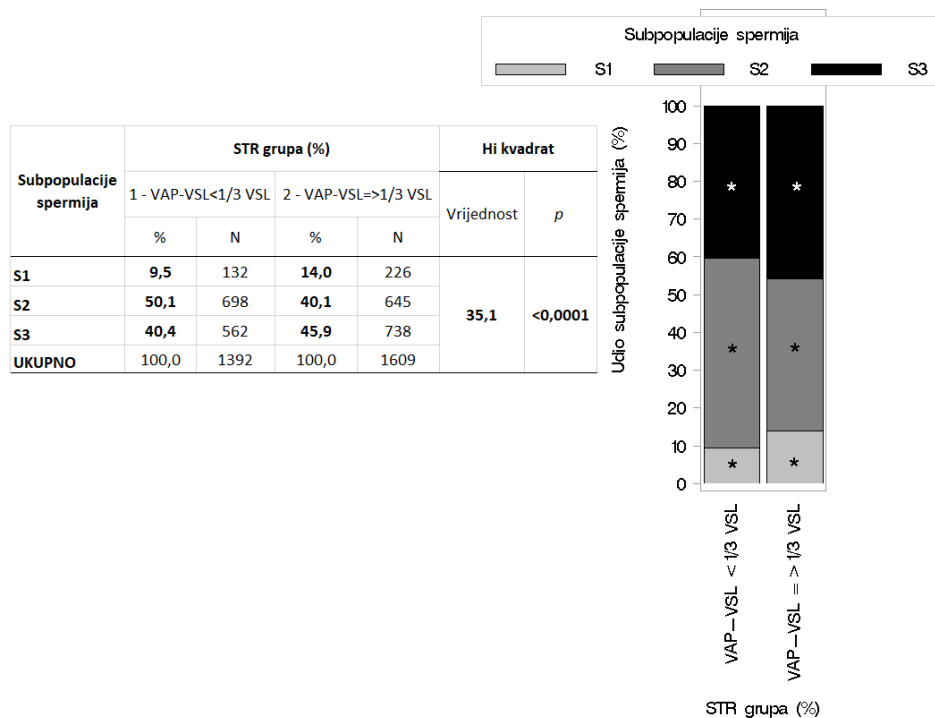
Slika 5.18. Udjeli subpopulacija spermija (S1 - spermiji s najmanjom eliptičnošću, elongacijom i pravilnošću glave, najkraćim repom i najvećom širinom spojnog dijela; S2 - najveći spermiji s najvećom glavom, spojnim dijelom i najduljim repom te najboljom eliptičnošću, elongacijom i pravilnosti glave; S3 - najmanji spermiji) grupirani prema prosječnoj brzini spermija na njegovoj prosječnoj putanji (VAP ≥ 67 - grupa 1; VAP < 67 – grupa 2)

Spermiji veće linearnosti krivolinijske putanje spermija uz konstantnu veću prosječnu brzinu spermija na njegovoj krivolinijskoj putanji odnosno gibljivi spermiji veće progresivnosti (VCL ≥ 93 , LIN ≥ 60 %; grupa 1) imali su statistički značajno ($p < 0,0001$) manji udio S1 (9,3 % vs 13,5 %) i S3 (40,8 % vs 47,6 %), a veći udio S2 (49,9 % vs 38,9 %) subpopulacije spermija od gibljivih spermija manje progresivnosti (VCL ≥ 93 , LIN < 60 %; grupa 2) (slika 5.19.).



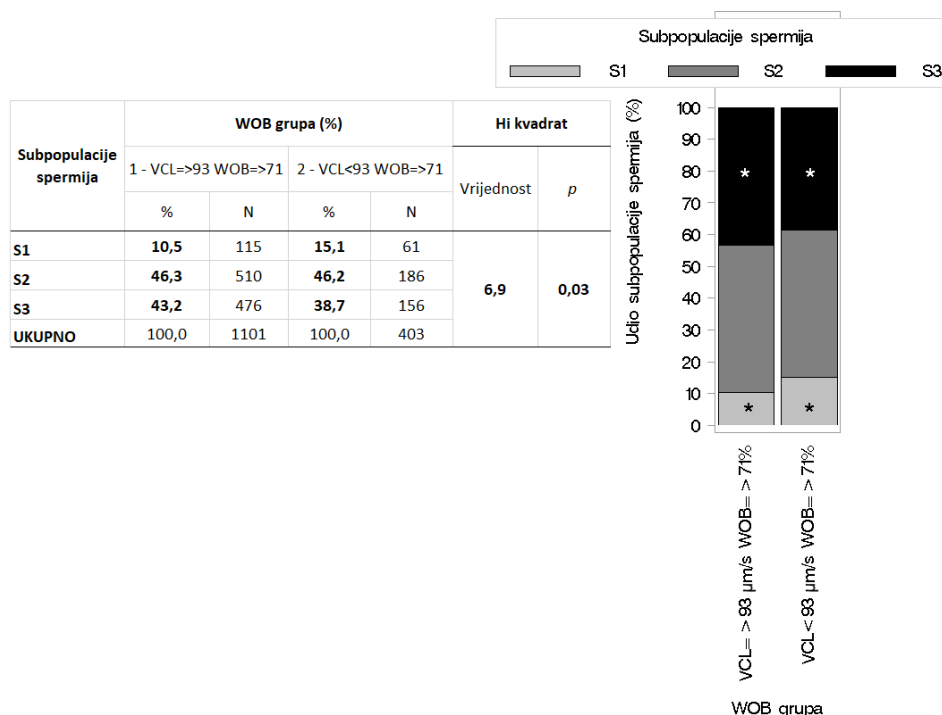
Slika 5.19. Udjeli subpopulacija spermija (S1 - spermiji s najmanjom eliptičnošću, elongacijom i pravilnošću glave, najkraćim repom i najvećom širinom spojnog dijela; S2 - najveći spermiji s najvećom glavom, spojnim dijelom i najduljim repom te najboljom eliptičnosti, elongacijom i pravilnosti glave; S3 - najmanji spermiji) grupirani prema linearnosti krivolinijske putanje spermija uz konstantnu veću prosječnu brzinu spermija na njegovoj krivolinijskoj putanji (VCL $\geq$ 93, LIN $\geq$ 60 % - grupa 1; VCL $\geq$ 93, LIN <60 % - grupa 2)

Spermiji bolje pravocrtnosti putanje spermija (STR) prema formuli (VAP-VSL <1/3 VSL; grupa 1) imali su statistički značajno ($p < 0,0001$) manji udio S1 (9,5 % vs 14,0 %) i S3 (40,4 % vs 45,9 %), a veći udio S2 (50,1 % vs 40,1 %) subpopulacije spermija od spermiji lošije pravocrtnosti putanje (VAP-VSL $\geq$ 1/3 VSL; grupa 2) (slika 5.20.).



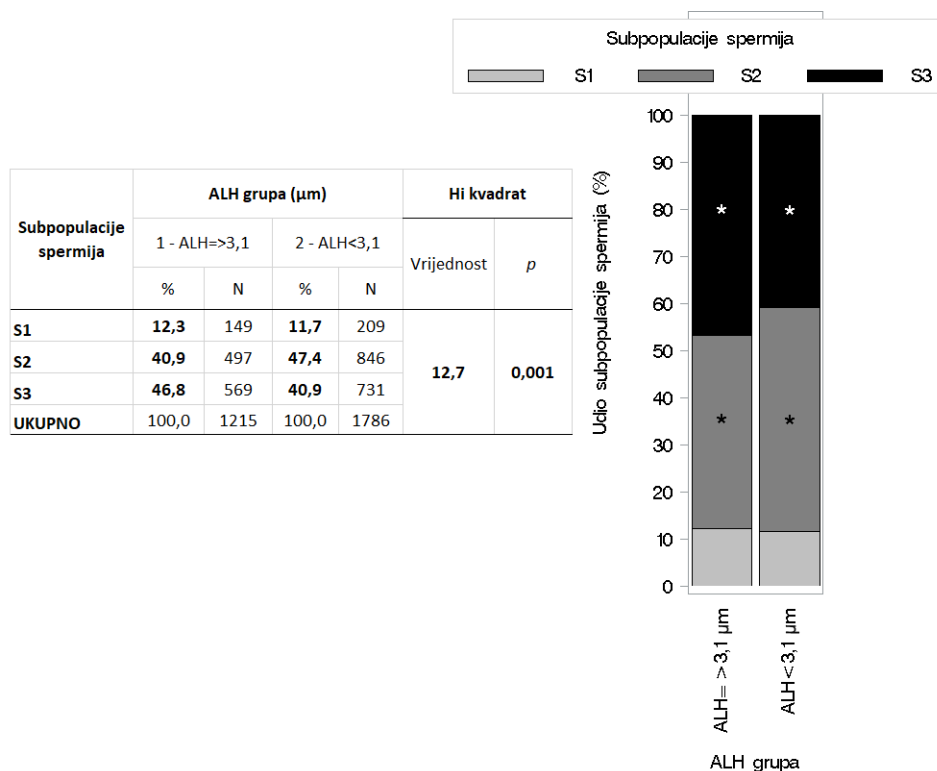
Slika 5.20. Udjeli subpopulacija spermija (S1 - spermiji s najmanjom eliptičnošću, elongacijom i pravilnošću glave, najkraćim repom i najvećom širinom spojnog dijela; S2 - najveći spermiji s najvećom glavom, spojnim dijelom i najduljim repom te najboljom eliptičnosti, elongacijom i pravilnosti glave; S3 - najmanji spermiji) grupirani prema pravocrtности putanje spermija (STR) (VAP-VSL < 1/3 VSL - grupa 1; VAP-VSL ≥ 1/3 VSL - grupa 1)

Spermiji veće prosječne brzine spermija na njegovoj krivolinijskoj putanji uz konstantan stupanj oscilacije stvarne putanje u odnosu na prosječnu putanju spermija (VCL ≥ 93; WOB ≥ 71; grupa 1) imali su statistički značajno ($p=0,03$) manji udio S1 (10,5 % vs 15,1 %), a veći udio S3 (43,2 % vs 38,7 %) subpopulacije spermija od grupe spermija manje prosječne brzine na krivolinijskoj putanji uz konstantan stupanj oscilacije stvarne putanje u odnosu na prosječnu putanju spermija (VCL < 93; WOB ≥ 71; grupa 2) (slika 5.21.).



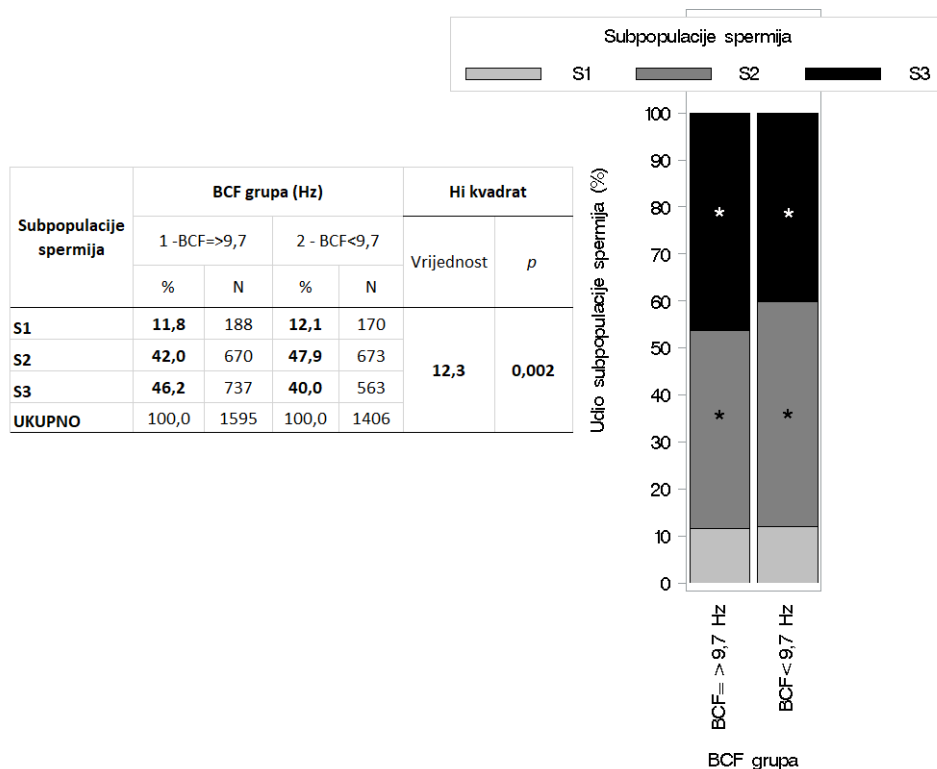
Slika 5.21. Udjeli subpopulacija spermija (S1 - spermiji s najmanjom eliptičnošću, elongacijom i pravilnošću glave, najkraćim repom i najvećom širinom spojnog dijela; S2 - najveći spermiji s najvećom glavom, spojnim dijelom i najduljim repom te najboljom eliptičnosti, elongacijom i pravilnosti glave; S3 - najmanji spermiji) grupirani prema prosječnoj brzini spermija na krivolinijskoj putanji uz konstantan stupanj oscilacije stvarne putanje u odnosu na prosječnu putanju spermija (VCL $\geq$ 93, WOB $\geq$ 71 - grupa 1; VCL<93, WOB $\geq$ 71 - grupa 2)

Spermiji većeg lateralnog otklona glave u odnosu na prosječnu putanju spermija (ALH $\geq$ 3,1; grupa 1) imali su statistički značajno ($p=0,001$) manji udio S2 (40,9 % vs 47,4 %), a veći udio S3 (46,8 % vs 40,9 %) subpopulacije spermija od grupe spermija manjeg lateralnog otklona glave u odnosu na prosječnu putanju spermija (ALH < 3,1; grupa 2) (slika 5.22.).



Slika 5.22. Udjeli subpopulacija spermija (S1 - spermiji s najmanjom eliptičnošću, elongacijom i pravilnošću glave, najkraćim repom i najvećom širinom spojnog dijela; S2 - najveći spermiji s najvećom glavom, spojnim dijelom i najduljim repom te najboljom eliptičnošću, elongacijom i pravilnosti glave; S3 - najmanji spermiji) grupirani prema lateralnom odklonu glave u odnosu na prosječnu putanju spermija (ALH $\geq 3,1$ - grupa 1; ALH $< 3,1$ - grupa 2)

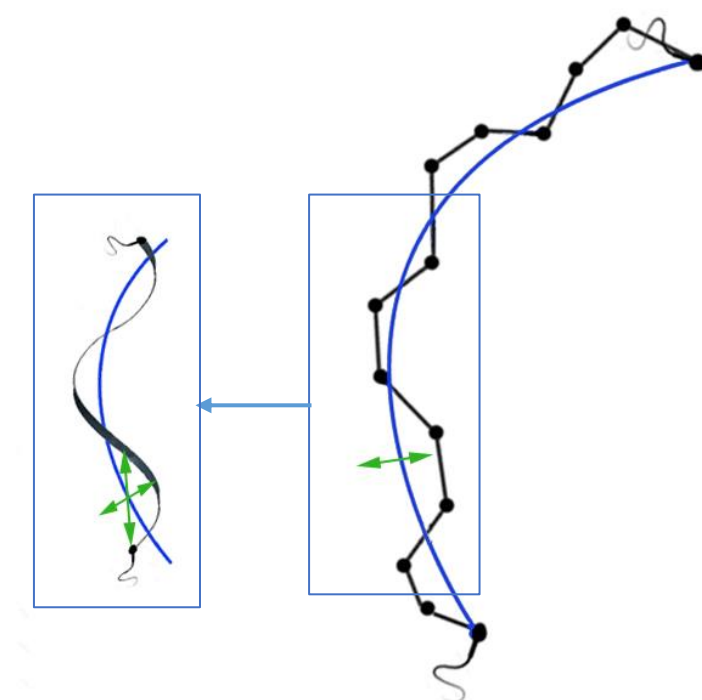
Spermiji većeg prosječnog broja prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje spermija ($\text{BCF} \geq 9,7$; grupa 1) imali su statistički značajno ($p=0,002$) manji udio S2 (42,0 % vs 47,9 %), a veći udio S3 (46,2 % vs 40,0 %) subpopulacije spermija od grupe spermija manjeg prosječnog broja prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje spermija ($\text{BCF} < 9,7$; grupa 2) (slika 5.23.).



Slika 5.23. Udjeli subpopulacija spermija (S1 - spermiji s najmanjom eliptičnošću, elongacijom i pravilnošću glave, najkraćim repom i najvećom širinom spojnog dijela; S2 - najveći spermiji s najvećom glavom, spojnim dijelom i najduljim repom te najboljom eliptičnosti, elongacijom i pravilnosti glave; S3 - najmanji spermiji) grupirani prema prosječnom broju prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje spermija (BCF $\geq$ 9,7 - grupa 1; BCF<9,7 – grupa 2)

5.8. ANALIZA TRODIMENZIONALNE PUTANJE GIBANJA S MORFOMETRIJSKIM POKAZATELJIMA SPERMIJA

U svrhu analize trodimenzionalne putanje spermija konvertiranjem dvodimenzionalne slike putanje iz CASA-e, izračunata je Z – os matematičkom formulom $VCL / (BCF / 2 \times ALH)$. Ovaj izračun trodimenzionalnog gibanja spermija pretpostavlja da je Z – os harmonična, što često nije slučaj pa je ova metoda dobra samo za vizualizaciju u kvalitativnom smislu, ali ne i za opisivanje kvantitativnih razlika u gibanju spermija (slika 5.24.). Dobiveni broj nam pokazuje koliki je promjer heliksa oko zamišljene prosječne putanje spermija te njegova srednja vrijednost i standardna devijacija iznosi $61,4 \pm 19,3$. Grupiranjem ovog trodimenzionalnog gibanja u dvije grupe (Heliks $\geq 61,4$ – grupa 1; Heliks $< 61,4$ – grupa 2) rezultati pokazuju da spermiji s većim heliksom (grupa 1) imaju veću prosječnu brzinu spermija na njenoj krivolinijskoj putanji ($106,8 \mu\text{m/s}$ vs $82,3 \mu\text{m/s}$), ali bez razlika u progresivnosti gibanja (LIN, STR). Isto tako, spermiji većeg promjera heliksa (grupa 1) imali su statistički značajno manju ($p < 0,0001$) duljinu spojnog dijela repa ($13,40 \pm 0,03 \mu\text{m}$ vs $13,66 \pm 0,02 \mu\text{m}$), ali s druge strane značajno veću ($p < 0,0001$) duljinu repa ($50,01 \pm 0,07 \mu\text{m}$ vs $49,44 \pm 0,06 \mu\text{m}$). Nisu nađene razlike među proporcijama subpopulacija spermija između grupa.



Slika 5.24. Prikaz trodimenzionalne putanje spermija oko njegove zamišljene prosječne putanje

6. RASPRAVA

6.1. KINETIČKI POKAZATELJI SPERMIJA

Jedna od danas neizostavnih metoda procjene kakvoće sjemena je procjena gibljivosti spermija. Gibljivost spermija smatra se glavnim čimbenikom plodnosti rasplodnjaka zbog njihove sposobnosti migracije kroz ženske spolne organe i interakcije s jajnom stanicom tijekom oplodnje (RODRÍGUEZ-MARTINEZ, 2006., SUAREZ i PACEY, 2006.). Sam mehanizam transporta spermija kroz spolni sustav nije još u potpunosti objašnjen, ali se zna da je prva prepreka na putu spermija do jame stanice cervikalna sluz. Zbog cervikalne sluzi isfiltrirati će se spermiji s lošom gibljivošću i morfologijom tako da će od ukupnog broja spermija njih samo nekoliko tisuća dosegnuti spoj materničnog roga s jajovodom (SUAREZ i PACEY, 2006.). Gibljivost spermija značajno utječe na njihovu sposobnost migracije i kolonizacije spoja materničnog roga s jajovodom, što je ključno za uspješnu oplodnju. Studije su pokazale da obrasci gibljivosti spermija u koza imaju važnu ulogu u ovom procesu (COX i sur., 2006.). Stoga je sposobnost spermija da prođu kroz cervikalnu sluz važan čimbenik u procesu oplodnje. Nekada se gibljivost sjemena uobičajeno procjenjivala vizualno mikroskopski putem masovne i progresivne gibljivosti, no te metode su bile dosta subjektivne i neprecizne. Računalno potpomognuta analiza sjemena (CASA) razvijala se preko 40 godina zbog napretka uređaja za snimanje slike, računala, računalnih jezika i novijih softverskih algoritama (AMANN i WABERSKI, 2014.). Današnji moderni sustavi CASA uređaja pregledavaju više polja u tzv. leja-komorici za uzorke snimajući stroboskopske slike (do 2000 spermija) pri 50 ili 60 sličica u sekundi te za manje od dvije minute nakon pregledanih ≥ 30 okvira procjenjuju i daju informacije o svakom spermiju i populaciji spermija (AMANN i WABERSKI, 2014.). Sam osnovni koncept za prepoznavanje spermija i praćenja obrasca njihova gibanja malo su promijenjeni u tih 40 godina. Većina današnjih CASA uređaja uspostavlja tzv. središte (centroid) za svaki spermij te procjenjuje gibanje spermija temeljeno na putanji centroida te povezuje svojstva svakog piksela na slici koji prikazuje mnogo spermija s vremenskim fluktuacijama signala iz istog piksela u uzastopnim slikama (RIGLER i sur., 2011.). Pojednostavljeno, kretanje svakog spermija bilježi se kao promjena u položaju središta u više uzastopnih okvira te se proračunski omogućuju izlazne mjere koje opisuju gibanje spermija. CASA uređaji tako omogućuju objektivnu i kvantitativnu točnu procjenu više kinetičkih pokazatelja, poput parametara gibanja, brzine i snage spermija (MORTIMER, 2000.). Danas se procjena kinetičkih pokazatelja spermija može izvršiti na svježem ejakulatu, ali i na prethodno smrznutom ejakulatu nakon otapanja (O'CONNELL i sur., 2002.). Postoje tri glavna pokazatelja brzine spermija koje procjenjuju CASA uređaji. To su prosječna brzina spermija na njegovoj

krivolinijskoj putanji (VCL), prosječna brzina spermija na njegovoj pravolinijskoj putanji (VSL) i prosječna brzina spermija na njegovoj prosječnoj putanji (VAP). Iz tih pokazatelja programski softver automatski izračunava pokazatelje progresivne gibljivosti ili pravocrtnosti putanje prema naprijed: linearnost krivolinijske putanje spermija ($LIN = VSL/VCL$) i pravocrtnost putanje spermija ($STR = VSL/VAP$). Procjena snage spermija vrši se mjerenjem lateralnog odklona glave u odnosu na prosječnu putanju spermija (ALH) i prosječnim brojem prelazaka krivolinijske putanje preko pravolinijske putanje spermija (BCF). Dodatni pokazatelji koji neki CASA uređaji omogućuju su stupanj oscilacije stvarne putanje spermija u odnosu na prosječnu putanju spermija ($WOB = VAP/VCL$), stupnjevi gibljivosti spermija (brza progresivna gibljivost $>40 \mu\text{m/s}$ VCL i $LIN \geq 60 \%$; spora-srednja ili troma progresivna gibljivost $20 \leq VCL \leq 40 \mu\text{m/s}$; gibljivi, ali ne progresivno $>40 \mu\text{m/s}$ VCL i $LIN < 60 \%$) te postotak brzih, srednje brzih, sporih i nepokretnih spermija. U ovom istraživanju srednja vrijednost VCL spermija jarčeva iznosila je $93,0 \mu\text{m/s}$ te je bila slična brzini ostvarenoj kod ANAND i YADAV, (2016.; $90,2 \mu\text{m/s}$), ali u prosjeku nešto veća od prosječne brzine ($63,7$ do $87,4 \mu\text{m/s}$) ostvarene u jarčeva ostalih autora (ANAND i sur., 2017., SILVA i sur., 2016., SILVA i sur., 2019., SILVA i sur., 2020., LUKUSA i KABUBA, 2020.) koji su u svom istraživanju većinom testirali različite dodatke i koncentracije dodataka razrjeđivaču u postupku smrzavanja ejakulata. Prosječna VSL u ovom istraživanju iznosila je $50,0 \mu\text{m/s}$ te je u skladu s ostalim istraživanjima gdje je u prosjeku iznosila od $37,4 \mu\text{m/s}$ do $64,8 \mu\text{m/s}$ (ANAND i sur., 2017., SILVA i sur., 2016., SILVA i sur., 2019., SILVA i sur., 2020., LUKUSA i KABUBA, 2020.). Slični rezultati usporedivi su i s VAP brzinom spermija ovog istraživanja ($67,1 \mu\text{m/s}$) koja je u skladu s ostalim istraživanjima VAP brzine spermija ($39,4$ do $72,7 \mu\text{m/s}$) nakon otapanja (ANAND i sur., 2017, SILVA i sur., 2016, SILVA i sur., 2019, SILVA i sur., 2020, LUKUSA i KABUBA, 2020.). Pokazatelji pravocrtnosti putanje spermija LIN i STR u ovom istraživanju su prosječno iznosili $60,0$ i $74,5 \%$ te se nalaze u sredini raspona ostalih istraživanja gdje je LIN iznosio između $31,8$ i $78,1 \%$ te STR koji je iznosio između $68,4$ i $88,5 \%$ (ANAND i sur., 2017, SILVA i sur., 2016, SILVA i sur., 2019, SILVA i sur., 2020.). Pokazatelji snage spermija ALH i BCF u ovom istraživanju su iznosili $3,1 \mu\text{m}$ i $9,7 \text{ Hz}$ što je isto tako u skladu s ostalim istraživanjima gdje je ALH iznosio između $1,92$ i $3,57 \mu\text{m}$ te BCF koji je bio između $8,65$ i $12,65 \text{ Hz}$ (ANAND i YADAV, 2016., SILVA i sur., 2016, SILVA i sur., 2019, SILVA i sur., 2020.).

6.2. MORFOMETRIJSKI POKAZATELJI SPERMIJA

Spermij je gledajući morfološki najrazličitija vrsta stanice, a ta raznolikost mu omogućuje prilagodbu na različite uvjete okoline tijekom oplodnje i samog procesa oplodnje (PITNICK i sur. 2009). Ta raznolikost se ne odnosi samo na vrstu životinje nego postoje i pasminske razlike što bi

značilo da su neke karakteristike spermija genetski određene (LAVARA i sur. 2013.) te razlike unutar jedinki iste pasmine što odražava njihovo porijeklo (MAROTO-MORALES i sur. 2010.). Prvi početci morfometrije zabilježeni su već 1915. godine i bila je bazirana na biometričkom mjerenju duljine glave spermija. Kasnije je ta biometrijska analiza zaboravljena jer je oduzimala puno vremena i zato što nije uključivala i širinu glave odnosno volumen glave te se veći naglasak stavljao na istraživanju patoloških oblika glave, spojnog dijela i repa spermija. Takva rutinska procjena spermija uključivala je procjenu normalne morfologije spermija odnosno procjenu broja patoloških oblika stanica, no zbog subjektivnosti takva procjena je imala ograničenu vrijednost za praktičnu upotrebu (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2006.). Kako bi se smanjila subjektivnost, ali i poboljšala ponovljivost i osjetljivost morfometrijske procjene spermija uvedena je računalno potpomognuta analiza slike (MAROTO-MORALES i sur., 2016.). Sustavi za automatsku obradu slike zamijenili su klasične metode mjerenja dimenzija glave spermija kod različitih vrsta pa tako i u jarčeva (HIDALGO i DORADO, 2009.). Danas morfometrijska analiza spermija pomoću računalnih sustava ima središnju ulogu u analizi morfologije (YÁNIZ i sur. 2015.). U ovom istraživanju morfometrija spermija odrađena je pomoću računalno potpomognutog programskog paketa za analizu slike SFORM koji nije mogao automatski odrediti granice spermija prilikom mjerenja, ali pruža mogućnost ručne korekcije. Na taj način program je nakon označavanja spermija automatski izmjerio morfometrijske parametre veličine spermija kao što su duljina, širina, minimalni i maksimalni polumjer, površina i opseg glave i spojnog dijela spermija te duljina repa. Morfometrijski parametri oblika spermija dobiveni različitim formulama prethodnih mjerenja veličine uključivali su eliptičnost, elongaciju, naboranost i pravilnost glave. Osim toga analizirali su se i različiti morfometrijski pokazatelji omjera glave, spojnog dijela i repa spermija.

Oblik i veličina spermija je različita u sisavaca. Općenito veliki sisavci imaju spermije manje duljine. Veliki sisavci imaju i potrebu za proizvodnjom većeg broja spermija zbog veličine ženskog spolnog sustava i mogućnosti da veliki broj spermija ne dospije do jajne stanice (PHILIPS i GILL, 1991.). Upravo veliki broj spermija u većih sisavaca uzrokuje jaču selekciju spermija (LUPOLD i JOHN, 2015.). Selekcija spermija unutar ženskih spolnih organa ovisi o različitim čimbenicima, a morfologija spermija bi mogla biti jedan od njih (GARCIA-VAZQUEZ i sur., 2016.). Glavne promjene u dizajnu spermija zbog kompeticije idu u smjeru povećavanja brzine spermija (GOMENDIO i ROLDAN, 1991). Kompeticija između spermija u sisavaca pogoduje povećanju veličine svih dijelova spermija i izduženijoj glavi spermija što rezultira bržim plivanjem (TOURMENTE i sur., 2011.). Upravo zbog toga, kod sisavaca tip spermija posjeduje bič ili rep, dok je oblik glave spermija kod većine sisavaca, uključujući i jarca, u obliku žlice, što znači da je glava izdužena. Gledajući razlike u postotcima u morfometrijskim vrijednostima

spermija unutar 22 vrste sisavaca, najveće razlike su u duljini spojnog dijela spermija (191,5 %), a najmanje razlike su u duljini glave (100 %) (TOURMENTE i sur., 2011.). Prema istim autorima razlike u postotcima prema morfometrijskim vrijednostima spermija između 5 vrsta domaćih životinja (konj, svinja, bik, ovan, jarac) su 49,25 % za duljinu spojnog dijela spermija i samo 13 % za duljinu glave, što pokazuje da razlike u ovih 5 vrsta domaćih životinja nisu toliko velike. Za svježiji ejakulat jarca autori navode sljedeće mjere: širina glave 4,25 μm , duljina glave 8,27 μm , duljina spojnog dijela 11,38 μm , duljina repa 51,13 μm , ukupna duljina spermija 59,4 μm . Postoje istraživanja o utjecaju krioprezervacije na morfometrijske pokazatelje glave u više vrsta životinja pa tako i jarčeva (HIDALGO i sur., 2001., MARCO-JIMENEZ i sur., 2006.). Sva istraživanja su povezala značajnu redukciju u veličini glave spermija nakon smrzavanja u usporedbi sa svježim ejakulatom. Neki od razloga redukcije su najvjerojatnije osmotske promjene, promjene u staničnim odjeljcima, oštećenje ili gubitak akrosome te prekomjerna kondenzacija kromatina jezgre spermija. HIDALGO i sur. (2001.) ustanovili su da su promjene u veličini glave spermija jarčeva nakon smrzavanja manje ako je svježiji ejakulat bolje kakvoće. Zbog toga se danas jedinke mogu klasificirati kao dobre ili loše prema otpornosti njihovih spermija na procese krioprezervacije. Budući da se umjetno osjemenjivanje koza danas uglavnom provodi smrznutim ejakulatom, isti je korišten i u ovom istraživanju, prvenstveno radi lakše provedbe morfometrijske analize i analize gibljivosti. Prema MARCO-JIMENEZ i sur. (2006.) morfometrijski pokazatelji glave spermija su bili nešto manji nakon mjerenja odmrznutog ejakulata u usporedbi sa svježim ejakulatom. Tako je duljina glave iznosila 8,00 μm umjesto 8,16 μm , širina glave 3,42 μm umjesto 3,48 μm , površina glave 23,44 μm^2 umjesto 23,89 μm^2 i opseg glave 20,63 μm umjesto 20,81 μm . Uspoređujući te rezultate s prosječnim rezultatima ovog istraživanja (duljina glave 9,27 μm ; širina glave 4,78 μm ; površina glave 35,96 μm^2 i opseg glave 24,62 μm) svi parametri glave navedenog istraživanja su dosta manji i u svježem i odmrznutom ejakulatu. Razlog tome može biti različita tehnika bojenja i pripreme preparata za morfometrijsku analizu, ali najvjerojatnije je u pitanju pasminska osobina. Uspoređujući ovo istraživanje sa istraživanjem WIBOWOA i sur. (2013.), koji su koristili svježiji ejakulat lokalnih jarčeva indonezije, morfometrijski parametri glave (duljina glave 9,30-9,95 μm ; širina glave 4,85-5,36 μm ; površina glave 34,9-41,4 μm^2) su relativno slični našem istraživanju, dok su s druge strane različiti uspoređujući se sa svježim ejakulatom Barbari jarčeva (SINH i sur., 2014.) gdje su navedeni parametri glave bili dosta manji (duljina glave 7,80 μm ; širina glave 4,26 μm ; površina glave 29,4 μm^2). U prilog tome da su različiti morfometrijski parametri glave najvjerojatnije pasminsko svojstvo su slični rezultati uspoređujući ovo istraživanje s istraživanjem ŽURA ŽAJA i sur. (2018.) koji su koristili istu pasminu koza mjereći parametre u odmrznutom ejakulatu (duljina glave 9,07-9,28 μm ; širina

glave 4,80-4,99 μm ; površina glave 35,8-38,2 μm^2 i opseg glave 23,9-24,7 μm). Gledajući prethodno istraživanje i ostali morfometrijski parametri spermija su podjednaki ovom istraživanju. Tako su morfometrijski parametri oblika glave u ovom istraživanju (eliptičnost - 1,94; elongacija - 0,31; naboranost - 0,74; pravilnost - 0,96) gotovo jednaki istraživanju ŽURA ŽAJA i sur. (2018.) (eliptičnost - 1,84-1,88; elongacija - 0,29-0,30; naboranost - 0,78; pravilnost - 0,94-0,95), ali i sa istraživanjem SINH i sur. (2014.) (eliptičnost - 1,86; elongacija - 0,30; pravilnost - 0,90) osim kod naboranosti glave koja je u navedenom istraživanju bila nešto manja (0,60). Morfometrijski parametri veličine spojnog dijela i duljine repa spermija u ovom istraživanju (duljina spojnog dijela - 13,63 μm ; širina spojnog dijela - 1,94 μm ; površina spojnog dijela - 19,04 μm^2 ; opseg spojnog dijela - 30,92 μm i duljina repa - 51,75 μm) su podjednaki istraživanju ŽURA ŽAJA i sur. (2018.) (duljina spojnog dijela - 12,55-13,10 μm ; širina spojnog dijela - 1,71-1,92 μm ; površina spojnog dijela - 17,91-19,75 μm^2 ; opseg spojnog dijela - 28,72-29,96 μm i duljina repa - 49,2-52,0 μm). Slični rezultati morfometrijskih pokazatelja spojnog dijela i repa spermija nađeni su i u lokalnim jarčevima indonezije (WIBOWOA i sur., 2013.) (duljina spojnog dijela - 12,66-12,85 μm ; širina spojnog dijela - 2,0-2,34 μm ; površina spojnog dijela - 16,43-17,46 μm^2 i duljina repa - 50,33-50,67 μm), te u Barbari jarčeva (SINH i sur., 2014.) u duljini spojnog dijela (12,48 μm) i duljini repa (48,14 μm), dok su ostali morfometrijski pokazatelja spojnog dijela navedenog istraživanja bili smanjeni (širina spojnog dijela - 0,66 μm ; površina spojnog dijela - 8,54 μm^2).

6.3. ODNOS MORFOMETRIJSKIH POKAZATELJA PREMA KINETIČKIM POKAZATELJIMA SPERMIJA

U ovom istraživanju korišteno je nekoliko statističkih metoda kako bi se prikazao odnos morfometrijskih i kinetičkih pokazatelja spermija. Razlog tome bio je da se odnos morfometrijskih pokazatelja prema kinetičkim pokazateljima spermija analizira na više načina kako bi se ustvrdilo koji statistički model najbolje prezentira takve odnose uviđajući prednosti i mane svakog modela. Multivarijatna regresijska analiza kao jedan od modela statističke analize koristio se kako bi se ustvrdila linearna povezanost svakog kinetičkog pokazatelja zasebno s morfometrijskim pokazateljima spermija. Sličan model koristio se u istraživanju GIL i sur. (2009.), koji su istraživali funkcionalnu morfometrijsku povezanost svinjskih spermija prema njihovim kinetičkim pokazateljima. U njihovom istraživanju osim prethodno navedenog napravili su i analizu glavnih komponenata pomoću pet kinetičkih pokazatelja (LIN, STR, WOB, ALH i BCF) kako bi dobili glavne komponente (faktore) odnosno novi skup varijabli izvedenog linearnom

kombinacijom originalnih varijabli. Glavne komponente su karakteristične tako što ne koreliraju međusobno i zadržavaju što više informacija u izvornim varijablama i tako poboljšavaju interpretaciju rezultata. Prethodno navedeni autori su multivarijatnom linearnom regresijom ustanovili povezanost pet kinetičkih pokazatelja i dviju glavnih komponenata odnosno faktora (PC1- LIN, STR i WOB; PC2 – BCF) s određenim morfometrijskim pokazateljem, ponajviše s eliptičnost glave spermija i širinu spojnog dijela spermija sa STR ($p<0,008$; prilagođeni $R^2=0,59$), LIN ($p<0,005$; prilagođeni $R^2=0,70$), VCL ($p<0,02$; prilagođeni $R^2=0,90$) i PC1 ($p<0,005$; prilagođeni $R^2=0,64$). Za ALH su dobili linearnu povezanost s površinom glave spermija ($p<0,05$; prilagođeni $R^2=0,89$), za BCF s površinom spojnog dijela spermija ($p<0,05$; prilagođeni $R^2=0,58$), PC2 sa širinom i duljinom spojnog dijela te površinom glave spermija ($p<0,005$; prilagođeni $R^2=0,68$). Isti autori su osim rezultata pokazali i vrijednosti standardiziranog beta koeficijenta (β). On uspoređuje snagu učinka svake pojedinačne nezavisne varijable sa zavisnom varijablom. Što je veća apsolutna vrijednost beta koeficijenta, to je učinak jači, a pozitivni i negativni predznak standardiziranog beta koeficijenta ukazuje na povećanje ili smanjenje zavisne varijable u odnosu na povećanje nezavisne varijable. Tako su GIL i sur. (2009.) u svom istraživanju ustanovili da povećanje eliptičnosti glave spermija i širine spojnog dijela spermija uzrokuju nižu progresivnu (STR) i linearnu (LIN) pokretljivost spermija u nerasta te veću vrijednost VCL brzine spermija za identičnu srednju vrijednost VAP brzine spermija. U ovom statističkom modelu je osim standardiziranog beta koeficijenta testiran i faktor inflacije varijance (VIF). On se koristi kao dokaz da regresori međusobno ne koreliraju te ako je vrijednost VIF veća od 10 tada postoji značajna kolinearnost te se u tom slučaju rezultati odbacuju iako postoji statistička značajnost. Na taj način izdvojeno je tek nekoliko statistički značajnih veza kinetičkih pokazatelja s morfometrijskim pokazatelja uzimajući u obzir p vrijednost, beta standardizirani koeficijent i VIF. Za razliku od prethodnog istraživanja svinjskih spermija u ovom istraživanju STR je pozitivno korelirao s eliptičnošću glave spermija ($p=0,01$; $\beta=1,0$; $VIF=7,3$) što znači da s povećanjem jedne standardne devijacije eliptičnosti glave dolazi i do povećanja progresivne gibljivosti spermija. U ovom istraživanju su isto tako određene glavne komponente, ali ne iz kinetičkih nego iz morfometrijskih pokazatelja. Tako je u našem istraživanju STR pozitivno korelirao s faktorom 4 tj. faktorom širine spojnog dijela i duljine repa spermija ($p=0,004$; $\beta=1,2$; $VIF=7,1$), ali taj faktor objašnjava samo 9 % varijance za razliku od faktora 1 i 2 koji objašnjavaju zajedno preko 50 % varijance. Blizu statističke značajnosti u našem istraživanju bila je i linearna pokretljivost spermija ($p=0,06$) koja je za razliku od istraživanja sa spermijima nerasta rasla smanjivanjem širine spojnog dijela spermija ($\beta=-0,71$; $VIF=5,4$). Isto tako, prethodno navedeni autori povezuju veću vrijednost VCL brzine spermija s većom širinom spojnog dijela spermija. U

ovom istraživanju manja širina spojnog dijela spermija uzrokuje porast VSL ($p=0,02$; $\beta=-0,78$; $VIF=5,4$) i VAP ($p=0,01$; $\beta=-0,9$; $VIF=6,5$) brzine spermija. Slične rezultate kao GIL i sur. (2009.) za VCL su dobili ANDERSON i DIXON, (2002.) u svom istraživanju gibljivost spermija prema spojnog dijelu spermija u primata.

Indeks progresivnosti pokretljivosti (STR) i indeks linearnosti pokretljivosti spermija (LIN) su izvedenice iz omjera VSL prema VAP i VSL prema VCL brzini spermija. Logično je zaključiti da se bolja progresivnost i linearnost dobiju većom prosječnom VSL brzinom, a manjom prosječnom VAP i VCL brzinom spermija pa su u istraživanju progresivne gibljivosti spermija u našem istraživanju upravo najvažnija bila saznanja o brzini spermija. Spermiji u nerasta veće eliptičnosti glave i širine spojnog dijela imaju veću VCL brzinu, ali zato nižu progresivnost kretanja. Spermiji jarca u ovom istraživanju manje širine spojnog dijela imaju veću VSL i VAP brzinu. Prema Freude-ovom zakonu gibanja objekata u vodi, brzina nekog objekta u vodi se izračuna prema formuli $v = Fr \times \sqrt{g \times l}$, gdje g predstavlja gravitaciju ($9,8 \text{ m/s}^2$), a l duljinu objekta. Ako Freude-ov broj (Fr) bude konstantan onda se može zaključiti da dulji objekti postižu veću brzinu gibanja u tekućini. Postoji pozitivna korelacija između duljine stanica s bičem/repom i brzine kretanja u tekućini (KAMYKOWSKY, 1986.). Međutim, zbog fenomena dinamike tekućine nije svejedno u kakvom mediju se proučava gibanje spermija. Naime, u dinamici fluida jako je bitan Reynoldsov broj (Re) odnosno veličina koja pomaže u predviđanju protoka tekućine mjerenjem omjera inercijskih i viskoznih sila. Razrjeđivači u kojima su pohranjeni spermiji imaju manju viskoznost pa time i manji Re nego sluz u spolnim organima kroz koju spermij putuje do jajne stanice. Zbog toga, idealan fusiformni, elongirani oblik spermija možda nije toliko učinkovit u tekućinama s niskim Reynoldsovim brojem. Zato bi najbolje bilo ispitati brzinu spermija *in vivo* odnosno u spolnim organima gdje je sluz visoke viskoznosti. Zbog toga su možda za *in vitro* mjerenje važniji podaci o progresivnoj gibljivosti spermija nego o brzini spermija. U ovom istraživanju s multivarijatnom regresijskom analizom spermiji s većom eliptičnosti glave (izduljenja glava) imaju bolju progresivnost. Veća eliptičnost objekta u tekućini se povezuje s boljim hidrodinamičnim svojstvima koja bi trebala omogućiti veću brzinu (YÁNIZ i sur., 2015.). Ako brzina u tekućinama s niskim Reynoldsovim brojem nije stvarno mjerilo učinkovitosti ostaje onda za razjasniti zašto su se spermiji jarčeva s većom eliptičnosti glave u ovom istraživanju kretali pravocrtnije odnosno linearnije. Kretanje spermija u tekućini događa se više-manje u pravilnim valovima, savijanjem repa koji podsjeća na bič (GRAY, 1955.). Flagelarna propulzija spermija rezultira složenim putanjama spermija, ali uzrokuje i pomicanje (savijanje) glave (iste frekvencije kao i pomicanje repa) kao posljedica uravnoteženja sila i momenta savijanja repa. Pomicanje glave spermija u jednu pa drugu stranu od zamišljene središnje osi podložno je otporu

koji pruža tekućina u kojoj se spermiji gibaju. Logično je da spermiji s duljom, izduženijom glavom imaju veći otpor prilikom pomicanja glave u stranu te zbog toga vjerojatno drže pravocrtiji smjer kretanja u tekućini pod uvjetom da rep spermija nema neke patološke oblike. Taj lateralni otklon glave od središnje osi kao i broj prelazaka glave preko zamišljene središnje osi u CASA uređaju pratimo putem dviju mjera ALH i BCF. Tako su istraživanja na spermijima ljudi ustanovila veći indeks progresivne pokretljivosti spermija (STR) smanjenjem širine glave čime se dobije veća eliptičnost glave (GILLIES i sur., 2009.). Isti autori su potvrdili da spermiji manje duljine glave imaju više vrijednosti ALH što je vjerojatno uzrok manjeg otpora takve glave u tekućini prilikom pomicanja odnosno savijanja u stranu. Najbolje progresivno napredovanje bičjih spermija kroz protok tekućine (koja simulira ženski reproduktivni sustav) ostvareno je kada su VSL, VAP i VCL bili visoki, a BCF je imao najnižu vrijednost (EL-SHERRY i sur., 2017.). Navedena istraživanja idu u prilog našim rezultatima u kojima spermiji veće eliptičnosti glave (dulje glave, manje širine) imaju bolju STR i LIN pokretljivost. Ovaj model korištene analize dobro pokazuje međusobne korelacije morfometrijskih i kinetičkih pokazatelja, ali ima i nedostatke. Budući da CASA izračunava prosječne brzine svih spermija u komorici tako su se morfometrijske vrijednosti spermija morale svesti na prosječne morfometrijske vrijednosti za isti uzorak. Time se smanjio broj uzoraka morfometrijskih mjerenja. Nadalje, da bi ovakva analiza bila prihvatljiva trebali bi uzeti u obzir vrijednost standardiziranog beta koeficijenta i faktora inflacije varijance što mnoga istraživanja ne uzimaju. Multivarijantna analiza varijance morfometrijskih pokazatelja spermija za svaki kinetički pokazatelj je druga analiza koja je korištena u ovom istraživanju. Za razliku od prethodne analize ovdje su se koristili morfometrijski pokazatelji svakog spermija zasebno, a ne prosjek uzorka. Kinetički pokazatelji su kod ove analize grupirani u skupine. To je najčešće rađeno tako da bi se izračunala srednja vrijednost kinetičkog pokazatelja te se od te vrijednosti napravila podjela na grupu s većim i manjim vrijednostima. Prednost ovakve analize je što se mogu izraditi i specifične skupine prema određenim formulama tako da se koristi nekoliko kinetičkih pokazatelja zajedno. Tako se npr. može analizirati utjecaj morfometrijskih pokazatelja na spermije manje ili veće linearnosti uz zadržavanje visoke vrijednosti VCL brzine. Slično kao i u prethodnoj analizi i ovdje se prvo odredilo koje morfometrijske pokazatelje odabrati za svaki kinetički pokazatelj i to pomoću postepenog odabira (stepwise selection). Zanimljivo je što se u oba modela najviše u svim analizama uzimala u obzir duljina glave, odnosno čak 13 puta. Iako u prvom modelu duljina glave nije ulazila u razmatranja zbog visokog faktora inflacije varijance, u ovom modelu je bila statistički značajno različita prema čak šest kinetičkih pokazatelja (VCL, VAP, LIN, STR, WOB i ALH). Ono što ide u prilog prethodnoj analizi su veća duljina glave (9,24 μm) u skupini spermija s većom prosječnom LIN i

STR pokretljivosti ($LIN \Rightarrow 60\%$; $STR = VAP - VSL < 1/3 VSL$). Kako su LIN i STR omjeri VSL brzine naspram VCL i VAP brzine tako se bolja progresivnost izražava u spermija s većom VSL, a manjom VCL i VAP brzinom. Spermiji u ovom istraživanju s manjom VCL i VAP brzinom ($VCL < 93 \mu\text{m/s}$; $VAP < 67 \mu\text{m/s}$) imali su veću duljinu glave ($9,28 \mu\text{m}$ vs $9,21 \mu\text{m}$). MALO i sur. (2006.) su ustvrdili da je učinak veličine glave na hidrodinamiku spermija znatan. Proučavajući spermije crvenog jelena ustanovili su da je duljina glave u pozitivnoj korelaciji s VAP brzinom spermija, ali u svom istraživanju nisu dobili statistički značajnu razliku duljine glave prema VSL i LIN kinetičkim pokazateljima. Kao i u prvom statističkom modelu ovog istraživanja i u istraživanju prethodnih autora, pokazalo se da je izrazito teško takvom analizom dobiti bolji koeficijent korelacije ($r=0,371$) zbog izrazito visoke varijacije u obliku i veličini spermija u svakom uzorku te manjeg broja uzoraka ($n=36$). GRAVANCE i sur. (2009.) su potvrdili da spermiji izrazito plodnih bikova imaju izduljeniju i užu glavu koja se može povezati s boljom progresivnom gibljivošću spermija. Pomoću MANOVA analize uspjelo se povezati odnose nekoliko bitnih kinetičkih pokazatelja s duljinom glave koji se nadovezuju sa rezultatima prve analize, odnosno, da dulja glava postiže manje brzine spermija, ali ima pravocrtaniji smjer kretanja. Osim brzine i progresivne gibljivosti, istom analizom utvrđeno je da spermiji s većim lateralnim otklonom glave ($ALH \Rightarrow 3,1 \mu\text{m}$) imaju statistički značajno manju duljinu glave ($0,965 \mu\text{m}$ vs $0,971$) kao i u istraživanju GILLIES i sur. (2009.), što ide u prilog teoriji manjeg otpora kraće glave u tekućini prilikom pomicanja odnosno savijanja u stranu. Isto tako, čak je i analizom samo spermija koji imaju VCL brzinu jednaku ili veću od srednje vrijednosti ($VCL \Rightarrow 93 \mu\text{m/s}$) dobivena statistički značajna razlika u spermija s boljom linearnom putanjom ($LIN \Rightarrow 60\%$) koji su imali dulju glavu u odnosu sa spermijima gdje je LIN bio manji od srednje vrijednosti ($LIN < 60\%$). Spermiji s boljom linearnom gibljivošću ($LIN \Rightarrow 60\%$) u ovoj analizi imali su i veću duljinu spojnog dijela spermija ($13,55 \mu\text{m}$ vs $13,30 \mu\text{m}$), a spermiji s većom STR gibljivošću ($STR = VAP - VSL < 1/3 VSL$) su imali veću širinu i opseg spojnog dijela spermija ($2,01$ vs $1,96$ i $30,84$ vs $30,19$). S druge strane spermiji s većom duljinom spojnog dijela ($13,65 \mu\text{m}$ vs $13,43 \mu\text{m}$; $13,61 \mu\text{m}$ vs $13,47 \mu\text{m}$) su imali manju VCL brzinu ($VCL < 93 \mu\text{m/s}$) i manju VAP brzinu ($VAP < 67 \mu\text{m/s}$) koje su u nazivniku omjera s VSL brzinom za određivanje LIN i STR što je i logičan rezultat. ANDERSON i DIXON (2002.) pozitivno povezuju veličinu spojnog dijela spermija s mitohondrijskim opterećenjem i prema tome raspoloživoj energiji za veću brzinu spermija. GU i sur. (2019.) povezuju morfologiju i gibljivost spermija i funkciju mitohondrija. S druge strane MALO i sur. (2006.) povezuju kraću duljinu spojnog dijela s većom brzinom spermija slično kao i u našem istraživanju, dok GAGE i FRECLETON (2003.) ne nalaze vezu između veličine spojnog dijela ili mitohondrijalnog volumena i kompeticije spermija u preko 83 vrste sisavaca. Budući da

veća duljina spojnog dijela spermija ne mora odgovarati i većoj širini spojnog dijela možda bi bolji pokazatelji u ovakvim istraživanjima bili oni koji uključuju duljinu i širinu spojnog dijela zajedno kako bi se dobila ukupna veličina ili ukupni volumen spojnog kao što su površina ili opseg. U našem istraživanju spermiji veće VAP brzine ($\Rightarrow 67 \mu\text{m/s}$) su imali veću površinu spojnog dijela spermija ($19,09 \mu\text{m}^2$ vs $18,89 \mu\text{m}^2$), a spermiji veće STR gibljivosti ($\text{VAP-VSL} < 1/3 \text{ VSL}$) su imali izrazito veći opseg spojnog dijela spermija ($30,84 \mu\text{m}$ vs $30,19 \mu\text{m}$). Isto tako gledajući pokazatelje snage spermija, statistički značajno veću površinu spojnog dijela spermija ($19,05 \mu\text{m}^2$ vs $18,86 \mu\text{m}^2$; $19,18 \mu\text{m}^2$ vs $18,76 \mu\text{m}^2$) imali su spermiji s većim vrijednostima ALH ($\Rightarrow 3,1 \mu\text{m}$) i BCF ($\Rightarrow 9,7 \text{ Hz}$). Ovo je očiti dokaz da je ukupna veličina spojnog dijela poput površine ili opsega direktno povezana s brzinom, progresivnošću i snagom spermija prilikom gibanja ne referirajući se samo na duljinu spojnog dijela kao u istraživanjima SHANANI i sur. (2010.) i BIERLA i sur. (2007.) koji pozitivno koreliraju taj pokazatelj s plodnošću i količinom energije proizvedene u mitohondrijima ili samo na širinu spojnog dijela kao u istraživanju GIL i sur. (2009.) koji koreliraju taj pokazatelj s većom VCL brzinom spermija. Zadnje spomenuti autori isto tako pozitivno koreliraju površinu glave spermija s vrijednostima ALH pokazatelja. Lateralni otklon glave spermija (ALH) je izrazito važan pokazatelj gibljivosti odnosno snage spermija potrebne da spermij uspješno prijeđe prepreke poput cervikalne sluzi i penetracije zone pellucide (AITKEN i sur., 1985.). U ovom istraživanju utvrdilo se da spermiji s većim vrijednostima pravilnosti glave ($0,971$ vs $0,965$) imaju veće vrijednosti ALH pokazatelja ($\Rightarrow 3,1 \mu\text{m}$) što bi značilo da će spermiji pravilnije glave vjerojatno lakše prijeći dulji put i izvršiti penetraciju oocite. Duljina repa spermija pozitivno utječe na brzinu gibanja spermija (NOORAFSHAN i KARBALAY-DOUST, 2010.). Ovom analizom u ovom istraživanju ustanovilo se da su spermiji s duljim repom ($49,80 - 49,94 \mu\text{m}$ vs $49,46 - 49,59$) pripadali skupini spermija s većom VCL ($\Rightarrow 93 \mu\text{m/s}$), VSL ($\Rightarrow 50 \mu\text{m/s}$) i VAP ($\Rightarrow 67 \mu\text{m/s}$) brzinom spermija. Time su potvrđene pretpostavke da spermiji s duljim repom utječu na veću gibljivost spermija koji tako mogu prije stići do jajne stanice i izvršiti oplodnju (NOORAFSHAN i KARBALAY-DOUST, 2010.). Multivarijatnom analizom varijance dobije se bolji uvid u povezanost morfometrijskih pokazatelja s proizvoljno stvorenim skupinama kinetičkih pokazatelja, ali taj model nije dovoljno dobar za definiranje prave populacije spermija. Iz tog razloga rađena je i treća analiza, multivarijatna analiza grupiranja temeljena na analizi glavnih komponenata kako bi se odredila struktura subpopulacija spermija. Kako postoje individualne razlike u morfometrijskim pokazateljima spermija, sve spermije sličnih proporcija veličine i oblika glave te veličine spojnog dijela i repa će se svrstati u određenu grupu ili subpopulaciju. U ovom istraživanju takvom analizom dobivene su 3 subpopulacije spermija, svaka različita na sebi svojstven način. Prva subpopulacija spermija

(S1) ima najmanji udio (11,9 %) od ukupne populacije te se sastoji od spermija s najmanjom eliptičnošću, elongacijom i pravilnošću glave dok je s druge strane naboranost glave najveća među tri subpopulacije. Rep spermija ove subpopulacije je najkraći dok je širina spojnog dijela najveća. Druga subpopulacija spermija (S2) čini 44,8 % ukupne populacije te ju čine najveći spermiji čija glava ima najveću duljinu, širinu, opseg i površinu. Ovi spermiji imaju i najveću eliptičnost i elongaciju i pravilnost glave te najmanju naboranost glave. Spojni dio spermija ove subpopulacije ima najveću duljinu, površinu i opseg te imaju najduži rep. Prema prve dvije analize ova subpopulacija spermija bi se smatrala poželjnom u postizanju najbolje progresivne i linearne gibljivosti te najveće snage za put i penetraciju oocite. Treća subpopulacija spermija (S3) čini 43,3 % ukupne populacije te su to najmanji spermiji. Glava i spojni dio ovih spermija imaju najmanju duljinu, širinu površinu i opseg. Zadnji korak ove analizi je analizirati omjere takvih subpopulacija prema kategoriziranim pokazateljima kinetičkih pokazatelja koji su korišteni prilikom druge analize ovog istraživanja. Potonje dvije subpopulacije (S2 i S3) čine najveći udio od ukupnog dijela spermija (> 88 %), pa je proučavanje njihovih omjera prema grupama kinetičkim pokazateljima bio glavni interes ove analize. Takvom analizom potvrđeno je da najveći spermiji s najduljom i najeliptičnijom glavom (S2 subpopulaciji) čini veći udio (46,5 % vs 43,2 %) u grupi spermija s većom VSL brzinom ($\Rightarrow 50 \mu\text{m/s}$), koji istovremeno imaju znatno manji udio S1 subpopulacije spermija (10,5 % vs 13,2 %). Kako je već spomenuto spermiji s većom linearnom brzinom su oni koji se gibaju pravocrtnije. Zbog toga su spermiji veće LIN ($\Rightarrow 60 \%$) i STR (VAP-VSL < 1/3 VSL) gibljivosti imali izrazito veći udio spermija S2 subpopulacije (49,9 % vs 38,9 %; 50,1 % vs 40,1 %), a manji udio spermija S3 subpopulacije (40,8 % vs 47,6 %; 40,4 % vs 45,9 %). Na sposobnost spermija da prođe kroz cervikalnu sluz i dođe do spoja materničnog roga s jajovodom u koza utječu ponajviše obrasci gibljivosti (COX i sur., 2006.), a progresivna gibljivost je jedna od važnijih odrednica za proces oplodnje. U tom slučaju jarčevi ejakulati s većim udjelom spermija karakterističnih morfometrijskih osobina kao u S2 subpopulaciji bi najvjerojatnije bili plodniji. Da spermiji manje veličine glave i manje eliptičnosti nisu poželjna subpopulacija u kvalitetnom ejakulatu jarčeva dokazali su ŽURA ŽAJA i sur. (2018.) kada su proučavanjem subpopulacija spermija ustanovili puno manji udio takve subpopulacije prateći jarčeve tretirane melatoninom izvan rasplodne sezone u odnosu na kontrolne jarčeve netretirane melatoninom. Većina proučavanih ejakulata sisavaca ima dva tipa fiziološkog gibanja spermija. Normalna aktivna gibljivost spermija posljedica je simetričnog gibanja repa nižih amplituda koji tjera spermije u više-manje pravocrtno gibanje u relativno neviskoznim medijima a uloga takvog gibanja je dolazak do jajne stanice (AITKEN i sur., 1985.). Drugo fiziološko gibanje spermija je tzv hiperaktivirano gibanje, a posljedica je snažnog nelinearnog savijanja repa s povećanim

amplitudama. Takvo gibanje se opaža u blizini jajne stanice i pomaže spermijima u prolasku kroz sluz jajovoda i oplodni jajne stanice (SCHMIDT i KAMP, 2004.). Važni CASA pokazatelji kojima se može procijeniti način gibljivosti su ALH, BCF i VCL. U ovom istraživanju utvrđeno je da spermiji s višim vrijednostima ALH ($\Rightarrow 3,1 \mu\text{m}$) i BCF ($\Rightarrow 9,7$) imaju veći udio S3 subpopulacije (46,8 % vs 40,9 %; 46,2 % vs 40,0 %), a istovremeno manji udio S2 subpopulacije spermija (40,9 % vs 47,4 %; 42,0 % vs 47,9 %). Subpopulacija S3 koju čine spermiji najmanjih dimenzija veličine glave i spojnog dijela repa i tek nešto kraćim repom od S2 subpopulacije čine optimalnu subpopulaciju za prolazak kroz jajovod i penetraciju jajne stanice budući da imaju veći udio u grupama s višim vrijednostima ALH i BCF. Prilikom hiperaktivacije takvi spermiji bi imali veću vjerojatnost prolaska kroz jajovod i oplodnje. Vjerojatno je zato udio takve supopulacije (43,3 %) gotovo jednak S3 subpopulaciji spermija (44,8 %) te je teško tvrditi da je takva subpopulacija manje poželjna što sugeriraju neka istraživanja o veličini spermija. Tako RADWAN (1996.) u grinja govori o pozitivnoj korelaciji veličine spermija i uspjeha oplodnje. Isto tako, neka istraživanja govore o negativnom odnosu duljine spermija i trajanja života plodnih spermija (GOMENDIO i ROLDAN, 1993.) što se tumači tako da se dulji spermiji gibaju puno aktivnije pa se prije potroše (GOMENDIO i ROLDAN, 1991.). Gibljivost spermija se puno vremena proučavala pojedinačno za svaki pojedinačni spermij i pružila je puno važnih saznanja (GAFFNEY i sur., 2011.), ali da bi se dobila šira slika bilo je potrebno proučiti različite utjecaje na gibljivost i interakcije tih utjecaja zajedno (VAN de HOEK i sur., 2022.). Neka istraživanja gibljivosti spermija fokusirana su proučavanjem gibljivosti spermija blizu stijenke (SMITH i sur., 2009., DENISSENKO i sur., 2012.), zatim sposobnosti gibanja protiv struje tekućine što se naziva reotaksija (KANSTLER i sur., 2014.). Zadnje spomenuti autori su dokazali da se spermiji uzvodno gibaju spiralnim putanjama uz stijenku kružne cijevi. Mehanizmi reotaksije objašnjeni su utjecajem hidrodinamičkih i steričkih efekata (ISHIMOTO i GAFFNEY, 2016., OMORI i ISHIKAWA, 2016.). Isto tako, proučavana je i kemotaksija odnosno sposobnost receptora na glavi spermija da osjeti određene substance za privlačenje otpuštene iz jajne stanice (FRIEDRICH i sur., 2010.). Najnovija istraživanja nisu usmjerena samo na mehaniku fluida nego i na interakciju fluida i gibanje spermija u skupini. Tako su TAKETOSHI i sur. (2020.) potvrdili da je elasto-hidrodinamička sinkronizacija repova spermija koji plivaju jedan pored drugoga povećala brzinu gibanja za 16 %. Reynoldsov broj je puno manji kod gibanja pojedinačnog spermija nego skupine spermija zajedno, a kako je već prethodno napisano gibanje spermija je manje učinkovito kod malog Reynoldsovog broja. Takvo saznanje moglo bi biti jako važno za razumjevanje kolektivnog gibanja spermija, ali nas i navodi da razumjevanje oblika, veličine i funkcije spermija danas predstavlja izazov znanstvenicima jer su spermiji visoko specijalizirane stanice. Možda

podjednaki omjer najvećih odnosno najprogresivnijih spermija te najmanjih spermija s boljom mogućnošću prolaska jajovoda i penetracije oocite predstavlja optimalni omjer spermija u ejakulatu plodnih jarčeva sposobnih da zajedno svojim gibanjem prevladaju sve prepreke do oplodnje.

Ako se dulje vremena promatra gibanje spermija onda se primijeti da se spermiji u biti gibaju kružno ili spiralno (CORKIDI i sur., 2008.). U ovom istraživanju konvertirana je dvodimenzionalna putanja spermija iz CASA-e pomoću formule $VCL / (BCF / 2 \times ALH)$ u kojoj se pretpostavlja da je z-os harmonična, odnosno da je lateralni otklon glave jednak i u z-osi, što često nije slučaj pa je ova metoda dobra samo za vizualizaciju u kvalitativnom smislu, ali ne i za opisivanje kvantitativnih razlika u gibanju spermija. Vjerojatno zato nisu nađene razlike među odnosima subpopulacija između spermija s većom i manjom heliks putanjom.

7. ZAKLJUČCI

Rezultati istraživanja povezanosti morfometrijskih svojstava spermija s pokazateljima kakvoće odmrznutoga sjemena jarčeva omogućuju sljedeće zaključke:

1. Fuziformni oblik spermija s lagano izduljenom glavom i dugim repom je savršen za kontinuirano, ravnomjerno, propulzivno plivanje zbog svog povoljnog hidrodinamičkog oblika što se može usporediti s mnogim oblicima akvatičkih organizama.
2. Od svih morfometrijskih pokazatelja najviše utjecaja prema kinetičkim pokazateljima spermija imala je duljina glave spermija.
3. Veća duljina i bolja eliptičnosti glave spermija utječu na bolje progresivno (pravocrtnije) gibanje spermija potrebno za prevladavanje prepreka kroz ženski spolni sustav.
4. Spermiji s najmanjom glavom imaju veće vrijednosti ALH i BCF vjerojatno zbog manjeg hidrodinamičkog otpora tijekom pomicanja (savijanja) glave u stranu prilikom flagelarne propulzije.
5. Veća površina i opseg spojnog dijela spermija pozitivno utječu na pokazatelje brzine i snage spermija, ali vjerojatno imaju manji utjecaj od veličine i oblika glave.
6. Veća duljina repa spermija pozitivno utječe na sve pokazatelje brzine (VSL, VSL, VAP), a spermiji s kraćim repom vjerojatno kompenziraju taj nedostatak sa širim spojnim dijelom.
7. Podjednaki omjer subpopulacija najvećih odnosno najprogresivnijih spermija sposobnih za prevladavanje puta kroz cerviks i maternicu te najmanjih spermija s boljom mogućnošću prolaska jajovoda i penetracije oocite vjerojatno predstavlja optimalni omjer spermija u ejakulatu jarčeva, sposobnih da zajedno svojim gibanjem prevladaju sve prepreke do oplodnje.

Zaključno, dobiveni rezultati upućuju na to da morfometrijska svojstva spermija, poput duljine glave i repa te oblika spojnog dijela, značajno utječu na kinetičke pokazatelje i progresivno gibanje spermija ključno za oplodnju. Omjer različitih subpopulacija spermija, uključujući najveće i najprogresivnije te najmanje spermije s većom sposobnošću penetracije oocite, mogao bi predstavljati optimalan sastav za uspješno savladavanje prepreka u ženskom reproduktivnom sustavu. Daljnja istraživanja potrebna su za potvrdu i primjenu ovih zapažanja.

8. POPIS LITERATURE

- AHMED, M. M. M., S. A. MAKAWI, A. A. GADIR (1997): Reproductive performance of Saanen bucks under tropical climate. *Small Rumin. Res.* 26, 151–155.
- AITKEN, R. J., SUTTON, M., WARNER, P., RICHARDSON, D. W. (1985): Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 73, 441–449.
- ALVAREZ, L., B. M. FRIEDRICH, G. GOMPPER, U. B. KAUPP (2014): The computational sperm cell. *Trends Cell Biol.* 24, 198–207. doi: 10.1016/j.tcb.2013.10.004
- AMANN, R. P., D. WABERSKI (2014): Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81, 5–17.e3. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.004
- AMANN, R. P., D. WABERSKI (2014): Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81, 5–17.
- AMANN, R. P., G. E. SEIDEL Jr., R. G. MORTIMER (2000): Fertilizing potential *in vitro* of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology* 54, 1499–1515. doi: 10.1016/S0093-691X(00)00470-2
- ANAND, M., S. YADAV (2016): Assessment of motion and kinematic characteristics of frozen-thawed Sirohi goat semen using computer-assisted semen analysis. *Veterinar World* 9, 203–206. doi: 10.14202/vetworld.2015.203-206.
- ANAND, M., S. YADAV, S. VASWANI, P. SHUKLA (2017): Kinematic response of buck sperm to low-density lipoproteins in fresh diluted, short-term, and long-term stored semen. *J. Anim. Res.* 7, 1–5. doi: 10.5958/2277-940X.2017.00037.7.
- ANDERSON, M. J., A. F. DIXON (2002): Motility and midpiece in primates. *Nature* 416, 496.
- ASHDOWN, R. R., J. L. HANCOCK (1980): Functional anatomy of male reproduction. U: HAFEZ, E. S. E., Ed., *Reproduction in farm animals*, 4th edition, Lea and Febiger, Philadelphia, str. 230–245.

- AVIDOR-REISS, T., A. KHIRI, E. L. FISHMAN, K. H. JO (2015): Atypical centrioles during sexual reproduction. *Front. Cell Dev. Biol.* 3, 21.
- AYAD, B. M. (2018): Basic semen parameters assisted by Computer-Aided sperm analysis (CASA) and their correlations with advanced semen parameters in normozoospermic men with different abstinence periods. Doktorska disertacija, Sveučilište u Stellenbosch, Južnoafrička Republika.
- BAHAT, A., I. TUR-KASPA, A. GAKAMSKY, L. C. GIOJALAS, H. BREITBART, M. EISENBACH (2003): Thermotaxis of mammalian sperm cells: a potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nat. Med.* 9, 149–150. doi:10.1038/nm0203-149
- BALTZ, J. M., P. O. WILLIAMS, R. A. CONE (1990): Dense fibers protect mammalian sperm against damage. *Biol. Reprod.* 43, 485–491.
- BARKAWI, A. H., E. H. ELSAYED, G. ASHOUR, E. SHEHATA (2006): Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles, and testicular activity in Saraibi goats. *Small Rumin. Res.* 66, 209–213.
- BARTH, A. D., P. BOWMAN, B. BO, R. J. MAPLETOFF (1992): Effect of narrow sperm head shape on fertility in cattle. *Can. Vet. J.* 92, 31–39.
- BATH, G., J. DE WET (2000): Sheep and goat diseases. Tafelberg Publishers, Cape Town.
- BECKETT, S. D., D. F. WOLFE (1998): Anatomy of the penis, prepuce, and sheath. U: Wolfe, D., Moll, H.D., Eds., Large animal urogenital surgery, 2nd edition, Williams and Wilkins, Baltimore, str. 267–270.
- BENNISON, C., N. HEMMINGS, J. SLATE, T. BIRKHEAD (2015): Long sperm fertilize more eggs in a bird. *Proc. Biol. Sci.* 282, 20141897.
- BERTA, V. (2018): Utjecaj egzogenog melatonina na biokemijske pokazatelje i antioksidacijski status sjemene plazme francuskih alpskih jarčeva izvan rasplodne sezone. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
- BIERŁA, J. B., Z. GIŻEJEWSKI, C. M. LEIGH, H. EKWALL, L. SÖDERQUIST, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ, K. ZALEWSKI, W. G. BREED (2007): Sperm morphology of the Eurasian beaver *Castor fiber*: An example of a species of rodent with highly derived and pleiomorphic sperm populations. *J. Morphol.* 268, 683–689.

- BRETHERTON, F. P., F. R. S. ROTHSCILD (1961): Rheotaxis of spermatozoa. Proc. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci. 153, 490–502.
- BRITO, L. F. C. (2010): Variations in laboratory semen evaluation procedures and testing. U: Proceedings of the 23rd Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction. Milwaukee: NAAB, str. 61–67.
- BROEKHUIJSE, M. L. W. J., E. ŠOŠTARIĆ, H. FEITSMA, B. M. GADELLA (2011): Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. J. Anim. Sci. 90, 779–789. doi: 10.2527/jas.2011-4311
- BUCAK, M. N., M. B. ATAMAN, N. BASPINAR, O. UYSAL, M. TASPINAR, A. BILGILI, C. OZTURK, S. GUNGOR, M. E. INANC, E. AKAL (2015): Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. Andrologia 47, 545–552. doi:10.1111/and.12301
- BUENDÍA, P., C. SOLER, F. PAOLICCHI, C. GAGO, B. URQUIETA, F. PÉREZ-SÁNCHEZ, E. BUSTOS-OBREGÓN (2002): Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer® computer-assisted system. Theriogenology 57, 1207–1218.
- BUTKOVIĆ, I. (2021): Učinak radiofrekvencijskog elektromagnetskog zračenja na pokazatelje kakvoće, antioksidacijski status i oštećenje dnk-a *in vitro* ozračenog sjemena rasplodnih nerasta. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
- CARSON, R. L., P. A. POWE, D. A. PUGH (1997): Examination and special procedures of the scrotum and testes. U: Wolfe, D., Moll, H.D., Eds., Large Animal Urogenital Surgery, Williams and Wilkins, Baltimore, str. 343–348.
- CASTRO, L. S., A. F. P. SIQUEIRA, T. R. S. HAMILTON, C. M. MENDES, J. A. VISINTIN, M. E. O. A. ASSUMPÇÃO (2018): Effect of bovine sperm chromatin integrity evaluated using three different methods on *in vitro* fertility. Theriogenology 107, 142–148. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.006
- CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija. Veterinarski fakultet, Zagreb.

- CONSTANTINESCU, G. M., I. A. CONSTANTINESCU (2010): Functional anatomy of the goat. U: Solaiman, S. G., Goat science and production, Blackwell Publishing, Ames, USA, str. 120–123.
- CORKIDI, G., TABOADA, B., WOOD, C. D., GUERRERO, A., DARSZON, A. (2008): Tracking sperm in three-dimensions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373, 125–129.
- COX, J. F., ALFARO, V., MONTENEGRO, V., RODRIGUEZ, H. (2006): Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology* 66, 860–867.
- CUMMINS, J. M., P. F. WOODALL (1985): On mammalian sperm dimensions. *J. Reprod. Fertil.* 75, 153–175.
- DE JARNETTE, J. M., R. G. SAACKE, J. BAME, C. J. VOGLER (1992): Accessory sperm: Their importance to fertility and embryo quality, and attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle. *J. Anim. Sci.* 70, 484–491.
- DENISSENKO, P., V. KANTSLER, D. J. SMITH, J. KIRKMAN-BROWN (2012): Human spermatozoa migration in microchannels reveals boundary-following navigation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 8007–8010.
- DENISSENKO, P., V. KANTSLER, D. J. SMITH, J. KIRKMAN-BROWN (2012): Human spermatozoa migration in microchannels reveals boundary-following navigation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 8007–8010. doi: 10.1073/pnas.1202934109
- DEVENDRA, C., M. BURNS (1983): Goat production in the tropics. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, England.
- DRUART, X. (2012): Sperm interaction with the female reproductive tract. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 348–352.
- EDDY, E. M. (2006): The Spermatozoon. U: Physiology of reproduction, J. D. Neill, Ed., Elsevier Academic Press, San Diego, str. 1–54.
- EDDY, E. M. (2007): The scaffold role of the fibrous sheath. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65, 45–62.

- EDDY, E. M., K. TOSHIMORI, D. A. O'BRIEN (2003): Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc. Res. Tech.* 61, 103–115.
- EDMONDSON, M. A., J. F. ROBERTS, A. N. BAIRD, S. BYCHAWSKI, D. G. PUGH (2012): Theriogenology of sheep and goats. U: PUGH, D. G., A. N. BAIRD., Eds., *Sheep and goat medicine*, 2nd Ed., Elsevier, Amsterdam, Netherlands, str. 150–230.
- EISENBACH, M., L. S. GIOJALAS (2006): Sperm guidance in mammals-an unpaved road to the egg. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 276–285. doi: 10.1038/nrm1893
- ELGETI, J., G. GOMPPER (2009): Self-propelled rods near surfaces. *Eur. Phys. Lett.* 85, 38002.
- ELGETI, J., U. B. KAUPP, G. GOMPPER (2010): Hydrodynamics of sperm cells near surfaces. *Biophys. J.* 99, 1018–1026. doi: 10.1016/j.bpj.2010.05.015
- EL-SHERRY, T. M., M. A. ABDEL-GHANI, N. S. ABOU-KHALIL, M. ELSAYED, M. ABDELGAWAD (2017): Effect of pH on rheotaxis of bull sperm using microfluidics. *Reprod. Domest. Anim.* 52, 781–790.
- ESTESO, M. C., A. J. SOLER, M. R. FERNANDEZ-SANTOS, A. A. QUINTERO-MORENO, J. J. GARDE (2006): Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. *J. Androl.* 27, 662–670.
- FAWCETT, D. W. (1970): A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol. Reprod. Suppl.* 2, 90–127.
- FINELLI, R., K. LEISEGANG, S. TUMALLAPALLI, R. HENKEL, A. AGARWAL (2021): The validity and reliability of computer-aided semen analyzers in performing semen analysis: a systematic review. *Transl. Androl. Urol.* 10, 3069-3079. doi: 10.21037/tau-21-276.
- FIRMAN, C. R., L. W. SIMMONS (2009): Sperm midpiece length predicts sperm swimming velocity in house mice. *Biol. Lett.* 6, 513–516.
- FIRMAN, R. C., L. W. SIMMONS (2010): Sperm midpiece length predicts sperm swimming velocity in house mice. *Biol. Lett.* 6, 513–516.

- FRIEDRICH, B. M., I. H. RIEDEL-KRUSE, J. HOWARD, F. JULICHER (2010): High-precision tracking of sperm swimming fine structure provides strong test of resistive force theory. *J. Exp. Biol.* 213, 1226–1234.
- FUJITA, A., K. NAKAMURA, T. KATO, N. WATANABE, T. ISHIZAKI, K. KIMURA, A. MIZOGUCHI, S. NARUMIYA (2000): Ropporin, a sperm-specific binding protein of rhophilin, that is localized in the fibrous sheath of sperm flagella. *J. Cell Sci.* 113, 103–112.
- GAFFNEY, E. A., H. GADELHA, D. J. SMITH, J. R. BLAKE, J. C. KIRKMAN-BROWN (2011): Mammalian sperm motility: Observation and theory. *Annu. Rev. Fluid Mech.* 43, 501–528.
- GAGE, M. J. (1998): Mammalian sperm morphometry. *Proc. Biol. Sci.* 265, 97–103.
- GAGE, M. J. G., R. FRECKLETON (2003): Relative testis size and sperm morphometry across mammals: no evidence for an association between sperm competition and sperm length. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 270, 625–632. doi: 10.1098/rspb.2002.2258.
- GALL, C. L. (1981): Goat production. academic press, London, New York, Toronto, San Francisco.
- GANJAM, V. K., R. P. AMANN (1976): Steroids in fluids and sperm entering and leaving the bovine epididymis, epididymal tissue and accessory sex gland secretions. *Endocrinol.* 99, 1618–1630.
- GARCÍA-HERREROS, M., C. L. LEAL (2015): Sperm volumetric dynamics during *in vitro* capacitation process in bovine spermatozoa. *Animal* 9, 1016–1024.
- GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A., I. HERNÁNDEZ-CARAVACA, W. YÁNEZ-QUINTANA, C. MATÁS, C. SORIANO-ÚBEDA, M. J. IZQUIERDO-RICO (2015): Morphometry of boar sperm head and flagellum in semen backflow after insemination. *Theriogenology* 84, 566–574.
- GARCIA-VAZQUEZ, F. A., J. GADEA, C. MATÁS, W. V. HOLT (2016): Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian J. Androl.* 18, 1–7.

- GIL, M. C., M. GARCÍA-HERREROS, F. J. BARÓN, I. M. APARICIO, A. J. SANTOS, L. J. GARCÍA-MARÍN (2009): Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology* 71, 254–263. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.07.007.
- GIL, M. C., M. GARCÍA-HERREROS, F. J. BARÓN, I. M. APARICIO, A. J. SANTOS, L. J. GARCÍA-MARÍN (2009): Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology* 71, 254–263. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.07.007
- GILLIES, E. A., R. M. CANNON, R. B. GREEN, A. A. PACEY (2009): Hydrodynamic propulsion of human sperm. *J. Fluid Mech.* 625, 445–474. doi: 10.1017/S0022112008005685.
- GOMENDIO, M., E. R. S. ROLDAN (1991): Sperm competition influences sperm size in mammals. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 243, 181–185.
- GOMENDIO, M., E. R. S. ROLDAN (1993): Coevolution between male ejaculates and female reproductive biology in eutherian mammals. *Proc. R. Soc. Lond. B* 252, 7–12.
- GOMENDIO, M., E. R. S. ROLDAN (2008): Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 439–477.
- GORDON, I. (1983): *Controlled breeding in farm animals*. Pergamon Press, Oxford, New York.
- GOYAL, H. O., M. MEMON (2007): Clinical reproductive anatomy and physiology of the buck. U: Youngquist, R.S., Threllfall, W.R., Eds., *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, 2nd edition, WB Saunders, Philadelphia, str. 511–514.
- GRAVANCE, C. G., M. E. CASEY, P. J. CASEY (2009): Pre-freeze bull sperm head morphometry related to post-thaw fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 114, 81–88.
- GRAY, J. (1955): The movement of sea-urchin spermatozoa. *J. Exp. Biol.* 32, 775–801.
- GREYLING, J. (2010): *Applied reproductive physiology*. U: Solaiman, S. G., *Goat science and production*, Blackwell Publishing, Ames, USA, str. 141–146.

- GREYLING, J. P. C. (1996): Induction of puberty in female Boer goat kids. Proc. 3rd Biennial Conference of the African SRR Network, UICC.
- GREYLING, J. P. C., J. A. N. GROBELAAR (1983): Seasonal variation in semen quality of Boer and Angora goat rams using different collection techniques. S. Afr. J. Anim. Sci., 13, 250–252.
- GREYLING, J. P. C., J. A. N. GROBELAAR (1988): Artificial insemination in sheep. Farming in South Africa, Mutton Sheep B.7/1988.
- GU, N. H., W. L. ZHAO, G. S. WANG, F. SUN (2019): Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. Reprod. Biol. Endocrinol. 17, 66. doi: 10.1186/s12958-019-0510-y.
- GU, N. H., W. L. ZHAO, G. S. WANG, F. SUN (2019): Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. Reprod. Biol. Endocrinol. 17, 66.
- HANSEN, C., T. VERMEIDEN, J. P. W. VERMEIDEN, C. SIMMET, B. C. DAY, H. FEITSMA (2006): Comparison of FACSCount AF system, Improved Neubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, SpermVision, UltiMate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen. Theriogenology. 66, 2188–2194. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.05.020
- HAZZOURI, M., S. ROUSSEAUX, F. MONGELARD, Y. USSON, R. PELLETIER, A. K. FAURE, C. VOURECH, B. SÉLE (2000): Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy. Mol. Reprod. Dev., 55, 307–315.
- HEATH, A. M., R. C. PUROHIT (1998): Anatomy of the scrotum, testes, epididymis, and spermatic cord (bulls, rams, and bucks). U: Wolfe, D., Moll, H.D., Eds., Large animal urogenital surgery, 2nd edition, Williams and Wilkins, Baltimore, str. 291–295.
- HIDALGO, M., I. RODRIGUEZ, J. M. DORADO (2001): The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. Anim. Reprod. Sci. 100, 61–72.

- HIDALGO, M., J. DORADO (2009): Objective assessment of goat sperm head size by computer-assisted sperm morphometry analysis (ASMA). *Small Rumin. Res.* 87, 108–110.
- HILL, J. (1996): Goat reproductive management. proceedings of the symposium on health and diseases of small ruminants, American Association of Small Ruminant Practitioners, Nashville, Tennessee.
- HUNTER, R. H. F. (1980): Physiology and technology of reproduction in female domestic animals. Academic Press, London, New York, Toronto.
- IMMLER, S., S. R. PRYKE, T. R. BIRKHEAD, S. C. GRIFFITH (2010): Pronounced within-individual plasticity in sperm morphometry across social environments. *Evolution* 64, 1634–1643.
- INABA, K. (2011): Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Mol. Hum. Reprod.* 17, 524–538.
- IRONS, M. J., Y. CLERMONT (1982): Formation of the outer dense fibers during spermiogenesis in the rat. *Anat. Rec.* 202, 463–471.
- ISHIKAWA, T. (2009): Suspension biomechanics of swimming microbes. *J. R. Soc. Interface* 6, 815–834.
- ISHIMOTO, K., E. A. GAFFNEY (2015): Fluid flow and sperm guidance: A simulation study of hydrodynamic sperm rheotaxis. *J. R. Soc. Interface* 12, 20150172.
- JAINUDEEN, M. R., H. WAHID, E. S. E. HAFEZ (2000): Sheep and goats. U: Reproduction in farm animals, 7th edition, W. B. Saunders Company, Philadelphia, str. 345–370.
- JIMÉNEZ-RABADÁN, P., A. J. SOLER, M. RAMÓN, O. GARCIA-ALVAREZ, A. MAROTO-MORALES, M. INIESTA-CUERDA, M. R. FERNÁNDEZ-SANTOS, V. MONTORO, M. D. PÉREZ-GUZMÁN, J. J. GARDE (2016): Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 167, 103–108. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.02.013.
- JIMÉNEZ-RABADÁN, P., RAMÓN, M., GARCÍA-ÁLVAREZ, O., MAROTO-MORALES, A., DEL OLMO, E., et al. (2012): Effect of semen collection method (artificial vagina

- vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. *Anim. Reprod. Sci.* 132, 88–95.
- KAMYKOWSKY, D. (1986): A survey of protozoan laboratory temperature studies applied to marine dinoflagellate behavior from a field perspective. *Contrib. Mar. Sci.* 27, 176–194.
- KANTSLE, V., J. DUNKEL, M. BLAYNEY, R. E. GOLDSTEIN (2014): Rheotaxis facilitates upstream navigation of mammalian sperm cells. *eLife* 3, e02403.
- KARAGIANNIDIS, A., S. VARSAKELI, G. KARATZAS (1999): Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen, and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology* 53, 1285–1293.
- KAUPP, U. B., N. D. KASHIKAR, I. WEYAND (2008): Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 93–117.
- KAYA, A., S. BIRLER, L. ENWALL, E. MEMILI (2014): Determinants of sperm morphology. U: *Animal andrology: Theories and applications*, P. J. Chenoweth and S. P. Lorton, Eds., CAB International, str. 34–56.
- KRUGER, T. F., DU TOIT, T. C., FRANKEN, D. R., ACOSTA, A. A., OEHNIGER, S. C., MENKVELD, R., LOMBARD, C. J. (1993): A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading. *Fertil. Steril.* 59, 202–209.
- LAUGA, E., T. R. POWERS (2009): The hydrodynamics of swimming microorganisms. *Rep. Prog. Phys.* 72, 096601.
- LAVARA, R., J. S. VICENTE, M. BASELGA (2013): Genetic variation in head morphometry of rabbit sperm. *Theriogenology* 80, 313–318.
- LEDEZMA-TORRES, R. A., F. SÁNCHEZ-DÁVILA, D. A. RODRÍGUEZ-MIRANDA, C. LUNA-PALOMERA, J. GRIZELJ, J. F. VÁZQUEZ-ARMIJO, N. LÓPEZ-VILLALOBOS (2022): Sexual performance and semen quality of pubertal lambs treated with different weaning methods. *Arch. Anim. Breed.* 20, 259-265. doi: 10.5194/aab-65-259-2022.
- LIN, J., D. NICASTRO (2018): Asymmetric distribution and spatial switching of dynein activity generates ciliary motility. *Science*. 360, eaar1968.

- LINDEMANN, C. B., K. A. LESICH (2016): Functional anatomy of the mammalian sperm flagellum. *Cytoskeleton (Hoboken)* 73, 652–669.
- LOVE, C. C. (2011): Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology* 76, 547–557.
- LUKUSA, K., J. KABUBA (2020): Semen collection methods and cooling rates affect post-thaw sperm motility and kinematic parameters of Saanen goat. *Asian Pac. J. Reprod.* 9, 239–246. doi: 10.4103/2305-0500.294666.
- LÜPOLD, S., S. CALHIM, S. IMMLER, T. R. BIRKHEAD (2009): Sperm morphology and sperm velocity in passerine birds. *Proc. Biol. Sci.* 276, 1175–1181.
- LUPOLD, S., L. F. JOHN (2015): Sperm number trumps sperm size in mammalian ejaculate evolution. *Proc. Biol. Sci.* 282, 20152122.
- MALLIDIS, C., T. G. COOPER, B. HELLENKEMPER, M. LABLANS, F. UCKERT, E. NIESCHLAG (2012): Ten years experience with an external quality control program for semen analysis. *Fertil. Steril.* 98, 611–616.e4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.05.006
- MALO, A. F., J. J. GARDE, A. J. SOLER, A. J. GARCIA, M. GOMENDIO, E. R. ROLDAN (2005): Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 72, 822–829.
- MALO, A. F., M. GOMENDIO, J. GARDE, B. LANG-LENTON, A. J. SOLER, E. R. S. ROLDAN (2006): Sperm design and sperm function. *Biol. Lett.* 2, 246–249.
- MARCO-JIMENEZ, F., M. P. VIUDES-DE-CASTRO, S. BALASCH, E. MOCE, M. A. SILVESTRE (2006): Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology* 52, 295–304.
- MAROTO-MORALES, A., M. RAMÓN, O. GARCÍA-ÁLVAREZ, A. J. SOLER, M. C. ESTESO, F. MARTÍNEZ-PASTOR, M. D. PÉREZ-GUZMÁN, J. J. GARDE (2010): Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. *Theriogenology* 73, 437–448.
- MAROTO-MORALES, A., O. GARCÍA-ÁLVAREZ, M. RAMÓN, F. MARTÍNEZ-PASTOR, M. R. FERNÁNDEZ-SANTOS, A. J. SOLER, J. J. GARDE (2016): Current status and potential of morphometric sperm analysis. *Asian J. Androl.* 18, 863–870.

- MASIDE, C., S. RECUERO, A. SALAS-HUETOS, J. RIBAS-MAYNOU, M. YESTE (2023): Animal board invited review: An update on the methods for semen quality evaluation in swine – from farm to the lab. *Animal* 17, 100720. doi: 10.1016/j.animal.2023.100720.
- MEMON, M. A., W. D. MICKELSEN, H. O. GOYAL (2007): Examination of the reproductive tract and evaluation of potential breeding soundness in the buck. U: Youngquist, R.vS., Threllfall, W.R., Eds., *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, 2nd edition, WB Saunders, Philadelphia, str. 515–518.
- MIKI, K., D. E. CLAPHAM (2013): Rheotaxis guides mammalian sperm. *Curr. Biol.* 23, 443–452.
- MIKI, K., W. QU, E. H. GOULDING, W. D. WILLIS, D.A O. BUNCH, L. F. STRADER, S. D. PERREAULT, E. M. EDDY, D. A. O'BRIEN (2004): Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16501–16506.
- MORTIMER, D. (2018): The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. *Mol. Hum. Reprod.* 24, 567–592.
- MORTIMER, S. T. (2000): CASA-practical aspects. *J. Androl.* 21, 515–524.
- MORTON, K. M., A. M. ROWE, W. M. MAXWELL, G. EVANS (2006): *In vitro* and *in vivo* survival of bisected sheep embryos derived from frozen-thawed unsorted, and frozen-thawed sex-sorted and refrozen-thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 65, 1333–1345.
- MOSSMAN, J., J.SLATE, S.HUMPHRIES, T.BIRKHEAD (2009): Sperm morphology and velocity are genetically codetermined in the zebra finch. *Evolution.* 63, 2730–2737.
- NAGY, S., A. JOHANNISSON, T. WAHLSTEN, R. IJÄS, M. ANDERSSON, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (2013): Sperm chromatin structure and sperm morphology: Their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. *Theriogenology* 79, 1153–1161.
- NANAMI, T., T. OMORI, T. ISHIKAWA (2020): Elasto-hydrodynamic interaction of two swimming spermatozoa. *Phys. Fluids* 32, 101901. doi: 10.1063/5.0022107.

- NISHIMURA, S., K. OKANO, K. YASUKOUCHI, T. GOTOH, S. TABATA, H. IWAMOTO (2000): Testis developments and puberty in the male Tokara (Japanese Native) Goat. *Anim. Reprod. Sci.*, 64, 127–131.
- NOORAFSHAN, A., S. KARBALAY-DOUST (2010): A simple method for unbiased estimating of ejaculated sperm tail length in subjects with normal and abnormal sperm motility. *Micron* 41, 96–99.
- O'CONNELL, M., N. MCCLURE, S. E. LEWIS (2002): The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum. Reprod.* 17, 704–709.
- O'MEARA, C., E. HENROTTE, K. KUPISIEWICZ, C. LATOUR, M. BROEKHUIJSE, A. CAMUS, L. GAVIN-PLAGNE, E. SELLEM (2022): The effect of adjusting settings within a Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) system on bovine sperm motility and morphology results. *Anim. Reprod.* 19, e20210077. doi: 10.1590/1984-3143-AR2021-0077
- O'DONNELL, L., M. K. O'BRYAN (2014): Microtubules and spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 30, 45–54.
- OLSON, G. E., D. W. SAMMONS (1980): Structural chemistry of outer dense fibers of rat sperm. *Biol. Reprod.* 22, 319–332.
- OMORI, T., T. ISHIKAWA (2016): Upward swimming of a sperm cell in shear flow. *Phys. Rev. E* 93, 032402.
- OSTERMEIER, G. C., G. A. SARGEANT, B. S. YANDELL, D. P. EVENSON, J. J. PARRISH (2001): Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *J. Androl.* 22, 595–603.
- PARTYKA, A., E. LUKASZEWICZ, W. NIZANSKI, J. TWARDON (2011): Detection of lipid peroxidation in frozen-thawed avian spermatozoa using C(11)-BODIPY(581/591). *Theriogenology* 75, 1623–1629. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.01.002
- PEÑA, F. J., F. SARAIVA, M. GARCÍA-HERREROS, I. NÚÑEZ-MARTÍNEZ, J. A. TAPIA, A. JOHANNISSON, M. WALLGREN, H. RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ (2005): Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to post-thaw quality. *J. Androl.* 26, 716–723.

- PHILIPS, D. M., L. D. GILL (1991): Comparative morphology of mammalian gametes. U: S. D. Bonnie, G. O. Michael (Eds.), *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*, Plenum Press, New York, NY, str. 37–50.
- PINEDA, M. H., L. C. FAULKNER (1980): The biology of sex. U: McDonald, L. E., Ed., *Veterinary endocrinology and reproduction*, 3rd edition, Lea and Febiger, Philadelphia, str. 180–185.
- PIOMBONI, P., R. FOCARELLI, A. STENDARDI, A. FERRAMOSCA, V. ZARA (2012): The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int. J. Androl.* 35, 109–124. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01218.x
- PITNICK, S., D. J. HOSKEN, T. R. BIRKHEAD (2009): Sperm morphology diversity. U: *Sperm Biology and Evolutionary Perspective*, Academic Press, Oxford, UK, str. 69–149.
- PUGH, D. G. (1996): Breeding soundness examination in male goats. *Proceedings of the Seventh Annual Hudson-Walker/Vaughn Theriogenology Conference*, Auburn University College of Veterinary Medicine, Auburn, Alabama, str. 29.
- QUINTERO-MORENO, A., T. RIGAU, J. E. RODRÍGUEZ-GIL (2007): Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 312–319.
- RADWAN, J. (1996): Intraspecific variation in sperm competition success in the bulb mite: A role for sperm size. *Proc. R. Soc. Lond. B* 262, 855–859.
- RAMON, M., A. J. SOLER, J. A. ORTIZ, O. GARCÍA-ÁLVAREZ, A. MAROTO-MORALES, E. R. S. ROLDAN, J. J. GARDE (2013): Sperm population structure and male fertility: An intraspecific study of sperm design and velocity in red deer. *Biol. Reprod.* 89, 110–114.
- RANA, T. (2024): *Elements of reproduction and reproductive diseases of goats*. Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey, USA.
- RESTALL, B. J. (1992): Seasonal variation in reproductive activity in Australian goats. *Anim. Reprod. Sci.*, 27, 305–318.
- RIBAS-MAYNOU, J., I. BARRANCO, A. SALAS-HUETOS (2023): Sperm quality and fertility of livestock animals. *Animals* 13, 604. doi: 10.3390/ani13040604.

- RIGLER, R., P. RIGLER, L. NILSSON (2011): Method and device for measuring dynamic properties of particles. US Patent 7,912,274 B2.
- RIVERA, G. M., G. A. ALANIS, M. A. CHAVES, S. B. FERRERO, H. H. MORELLO (2003): Seasonality of estrus and ovulation in Creole goats of Argentina. *Small Rumin. Res.* 48, 109–117.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2006): Can we increase the estimated value of semen assessment? *Reprod. Domest. Anim.* 41, 2–10.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. (2007): State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod. Fertil. Dev.* 19, 91–101.
- ROS-SANTAELLA, J. L., A. E. DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, J. J. GARDE (2014): Sperm flagellum volume determines freezability in red deer spermatozoa. *PLoS One* 9, e112382.
- ROSSITTO, M., C. MARCHIVE, A. PRUVOST, E. SELLEM, A. GHETTAS, S. BADIOU, T. SUTRA, F. POULAT, P. PHILIBERT, B. BOIZET-BONHOURE (2019): Intergenerational effects on mouse sperm quality after in utero exposure to acetaminophen and ibuprofen. *FASEB J.* 33, 339–357. doi: 10.1096/fj.201800488RRR
- RUBIO-GUILLÉN, J., D. GONZÁLEZ, J. J. GARDE, M. C. ESTESO, M. R. FERNÁNDEZ-SANTOS, J. E. RODRÍGUEZ-GIL, N. MADRID-BURY, A. QUINTERO-MORENO (2007): Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 354–357.
- SALAMON, S., W. M. MAXWELL (2000): Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 77–111.
- SANCHEZ-DAVILA, F., H. BERNAL-BARRAGAN, J. F. VAZQUEZ-ARMIJO, N. LÓPEZ-VILLALOBOS, R. A. LEDEZMA-TORRES, J. GRIZELJ, E. G. BRENNER, N. A. VASQUEZ, C. L. PALOMERA (2020): Annual variation in reproductive parameters and sexual behaviour of Saint Croix rams in a semi-desert region in Mexico. *J. Appl. Anim. Res.* 48, 499-506. doi: 10.1080/09712119.2020.1830778
- SCHMIDT, H., G. KAMP (2004): Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction* 128, 171–179.

- SERRES, C., D. ESCALIER, G. DAVID (1983): Ultrastructural morphometry of the human sperm flagellum with a stereological analysis of the lengths of the dense fibres. *Biol. Cell.* 49, 153–161.
- SETCHELL, B. P. (2014): Semen and Its Constituents. U: *Animal andrology: Theories and applications*, P. J. Chenoweth and S. P. Lorton, Eds., CAB International, str. 3–10.
- SHAHANI, S. K., S. G. REVELL, C. G. ARGO, R. D. MURRAY (2010): Mid-piece length of spermatozoa in different cattle breeds and its relationship to fertility. *Pak. J. Biol. Sci.* 13, 802–808.
- SHARPE, R. (1987): Testosterone and spermatogenesis. *J. Endocrinol.* 113, 1–2.
- SILVA, E. C. B., J. I. T. VIEIRA, I. H. A. V. NERY, R. A. J. ARAÚJO SILVA, V. F. M. H. LIMA, M. M. P. GUERRA (2020): Sorting and cryopreservation of goat sperm with or without phenolic compounds. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 72, 295–304. doi: 10.1590/1678-4162-11354.
- SILVA, E. C. B., L. C. P. ARRUDA, J. I. T. VIEIRA, P. C. SOARES, M. M. P. GUERRA (2019): (+)-Catechin and (-)-epigallocatechin gallate: Are these promising antioxidant therapies for frozen goat semen? *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 71, 521–528. doi: 10.1590/1678-4162-10539.
- SILVA, E. C. B., L. C. P. ARRUDA, S. V. SILVA, H. M. SOUZA, M. M. P. GUERRA (2016): High resveratrol or quercetin concentrations reduce the oscillation index of frozen goat semen. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 68, 1237–1243. doi: 10.1590/1678-4162-8670.
- SINHA, C., S. YADAV, B. YADAV, J. KUMAR, K. D. SINGH (2014): Objective assessment of sperm morphometry of Barbari bucks. *Indian J. Small Rumin.* 20, 129–131.
- SKOWRONEK, M. F., S. PIETROROIA, D. SILVERA, M. FORD, A. CASSINA, F. LECUMBERRY, R. SAPIRO (2024): Morphometric analysis of the sperm midpiece during capacitation. 1-19. doi: 10.21203/rs.3.rs-4145928/v1.
- SMITH, D. J., E. A. GAFFNEY, J. R. BLAKE, J. C. KIRKMAN-BROWN (2009): Human sperm accumulation near surfaces: A simulation study. *J. Fluid Mech.* 621, 289–320.

- SMITH, D., E. GAFFNEY, J. BLAKE, J. C. KIRKMAN-BROWN (2009): Human sperm accumulation near surfaces: a simulation study. *J. Fluid Mech.* 621, 289–320. doi: 10.1017/S0022112008004953
- SMITH, M. C. (1980): Caprine reproduction. U: Current therapy in theriogenology, diagnosis, treatment, and prevention of reproductive diseases in animals, D. A. Morrow, Ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, str. 320–325.
- SMITH, M. C., D. M. SHERMAN (1994): Goat medicine. Lea & Febiger, Philadelphia.
- SPRECHER, D. J., P. H. COE, R. D. WALKER (1999): Relationships among seminal culture, seminal white blood cells and the percentage of primary sperm abnormalities in bulls evaluated prior to the breeding season. *Theriogenology*, 51, 1197–1206.
- SUAREZ, S. S. (2008): Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 455–462.
- SUAREZ, S. S., A. A. PACEY (2006): Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum. Reprod. Update* 12, 23–37.
- SULLIVAN, J. J. (1978): Morphology and motility of spermatozoa. U: Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle, second edition, D. P. Salisbury, N. L. Van Demark, J. R. Lodge, Eds., W. H. Freeman Company, San Francisco, str. 286–328.
- THOMPSON, S. K., N. A. KUTCHY, S. KWOK, Z. N. A. ROSYADA, I. G. IMUMORIN, B. PURWANTARA, E. MEMILI (2018): Review: Sperm: Comparative morphology and function related to altered reproductive strategies and fertility in mammals. *Prof. Anim. Sci.* 34, 558–565. doi: 10.15232/pas.2018-01748
- TODINI, L., A. MALFATTI, G. M. TERZANO, A. BORGHESE, M. PIZZILLO, A. DEBENEDLETI (2007): Seasonality of plasma testosterone in males of four mediterranean goat breeds and three different climatic conditions. *Theriogenology* 67, 627–631.
- TOURMENTE, M., M. GOMENDIO, E. R. ROLDAN (2011): Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC Evol. Biol.* 11, 12.

- UNGERFELD, R., L. LACUESTA, A. ORIHUELA (2023): Stress response and sexual performance of acutely grouped dominant and subordinate rams of different ages. *J. Vet. Behav.* 59, 30-35. doi: 10.1016/j.jveb.2022.11.013.
- VALVERDE, A., H. ARENÁN, M. SANCHO, J. CONTELL, J. YÁNIZ, A. FERNÁNDEZ, C. SOLER (2016): Morphometry and subpopulation structure of Holstein bull spermatozoa: Variations in ejaculates and cryopreservation straws. *Asian J. Androl.* 18, 851–857. doi: 10.4103/1008-682X.187579.
- VAN DE HOEK, M., J. P. RICKARD, S. P. DE GRAAF (2022): Motility assessment of ram spermatozoa. *Biology* 11, 1–26. doi: 10.3390/biology11121715.
- VERSTEGEN, J., M. IGUER-OUADA, K. ONCLIN (2002): Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 57, 149–179. doi: 10.1016/S0093-691X(01)00664-1
- WARD, W. S., D. S. COFFEY (1991): DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol. Reprod.* 44, 596–574.
- WHO (2010): WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: World Health Organization.
- WIBOWOA, S. B., E. T. SETIATINB, E. KURNIANTOB (2013): The relationship between sperm morphometry and sperm competition in local goats of Central Java, Indonesia. *Media Peternakan* 36, 179–184.
- WILDDEUS, S. (1998): Reproductive management for meat goat production. Proceedings of the Southeast Region Meat Goat Producers Symposium, Tallahassee, Florida A & M University Press.
- WOOLLEY, D. M. (2003): Motility of spermatozoa at surfaces. *Reproduction* 126, 259–270.
- WOOLLEY, D. M., D. A. CARTER, G. N. TILLY (2008): Compliance in the neck structures of the Guinea pig spermatozoon, as indicated by rapid freezing and electron microscopy. *J. Anat.* 213, 336–341.
- YANAGIMACHI, R., G. CHERR, T. MATSUBARA, T. ANDOH, T. HARUMI, C. VINES, M. PILLAI, F. GRIFFIN, H. MATSUBARA, T. WEATHERBY, K. KANESHIRO

- (2013): Sperm attractant in the micropyle region of fish and insect eggs. *Biol. Reprod.* 88, 47. doi: 10.1095/biolreprod.112.105072
- YÁNIZ, J. L., C. SOLER, P. SANTOLARIA (2015): Computer assisted sperm morphometry in mammals: a review. *Anim. Reprod. Sci.* 156, 1–12.
- ZAMIRI, M. J., A. H. HEIDARI (2006): Reproductive characteristics of Rayini male goats of Kerman province in Iran. *Anim. Reprod. Sci.*, 96, 176–185.
- ZARAZAGA, L. A., J. L. GUZMAN, C. DOMINGUEZ, M. C. PEREZ, R. PRIETO (2005): Effect of plane of nutrition on seasonality of reproduction in Spanish Payoya goats. *Anim. Reprod. Sci.* 87, 253–267.
- ZHAO, W., Z. LI, P. PING, G. WANG, X. YUAN, F. SUN (2018): Outer dense fibers stabilize the axoneme to maintain sperm motility. *J. Cell Mol. Med.* 22, 1755–1768.
- ŽURA ŽAJA, I., S. VINCE, I. BUTKOVIĆ, K. SENAŠI, N. POLJIČAK MILAS, K. MALARIĆ, M. LOJKIĆ, I. FOLNOŽIĆ, S. MILINKOVIĆ TUR, M. KRESZINGER, M. SAMARDŽIJA, S. ČIPČIĆ, N. ŽURA, M. OSTOVIĆ, M. VILIĆ (2024): The distribution of boars spermatozoa in morphometrically distinct subpopulations after in vitro exposure to radiofrequency electromagnetic radiation at 2500 MHz and their motility. *Animals* 14, 828. doi:10.3390/ani14060828
- ŽURA ŽAJA, I., S. VINCE, S. MILINKOVIĆ-TUR, N. POLJIČAK MILAS, M. SAMARDŽIJA, H. VALPOTIĆ, V. BERTA, M. VILIĆ, K. RAKIĆ (2018): Exogenous melatonin influences distribution of French Alpine buck spermatozoa in morphometrically distinct subpopulations during the non-breeding season. *Anim. Reprod. Sci.* doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.03.003.

9. ŽIVOTOPIS S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

Snježana Čipčić rođena je 10. prosinca 1967. godine u Zagrebu, gdje je provela djetinjstvo i stekla svoje prvo obrazovanje. Strast prema životinjama oblikovala njen profesionalni put, pa se nakon osnovne škole odlučila upisati Srednju veterinarsku školu u Zagrebu, koju je pohađala od 1984. do 1986. godine. Tijekom školovanja razvila je duboko razumijevanje biologije, anatomije i njege životinja, što ju je dodatno motiviralo da nastavi obrazovanje u istom smjeru. Godine 1986. upisuje Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, gdje produbljuje svoje znanje o veterinarskoj medicini i zdravstvenoj zaštiti životinja. Fakultetsko obrazovanje joj je pružilo temelj za razumijevanje ne samo veterinarske struke, već i šireg područja medicine i zdravstvene skrbi. Kako bih nastavila akademski i profesionalni razvoj, 2012. godine upisuje magisterij na Veterinarskom fakultetu, što joj je omogućilo daljnju specijalizaciju i unaprjeđenje znanja. Svoju karijeru gradi u privatnoj tvrtki, gdje je stekla bogato iskustvo u prodaji i menadžmentu. Trenutno radi kao direktor prodaje i menadžer za prodaju stomatološke i medicinske opreme te transformacije specijalnih medicinskih vozila i njihovo opremanje medicinskim uređajima. Ova pozicija joj omogućava kombiniranje stručnog znanja s poslovnim vještinama, pri čemu svakodnevno komunicira s klijentima, analizira tržište, razvija prodajne strategije. Posao zahtijeva dinamičnost, pregovaračke sposobnosti i organizacijske vještine, i donosi zadovoljstvo jer spaja medicinsku struku s menadžmentom i prodajom. Osim profesionalnog angažmana, veliki dio života zauzima i ljubav prema konjima. Oduvijek je bila fascinirana njihovom elegancijom, snagom i inteligencijom, te se rado posvećuje jahanju i brizi o tim plemenitim životinjama. Ovaj hobi vrlo je brzo prerastao u profesionalni uzgoj sportskih konja čime se tvrtka također bavi na najvišim standardima koristeći embryotransfer te OPU / ICSI tehnologiju u suradnji sa najpoznatijim svjetskim laboratorijima za van tjelesnu oplodnju. Time je dodatno duboko vezana uz struku sa naglaskom na reprodukciju. Kroz život i karijeru vodi ju strast prema učenju, predanost poslu i ljubav prema životinjama.

Popis objavljenih radova

ŽURA ŽAJA, I., I. ŠVUB, S. MILINKOVIĆ- TUR, S. VINCE, H. VALPOTIĆ, D. ĐURIČIĆ, S. ČIPČIĆ, M. SAMARDŽIJA (2019): Biokemijski pokazatelji u sjemennoj plazmi domaćih životinja i ljudi (Biochemical parameters of seminal plasma in domestic animals and humans). Vet. stan. 50, 3, 223-237.

ŽURA ŽAJA, I., S. VINCE, I. BUTKOVIĆ, K. SENAŠI, N. POLJIČAK MILAS, K. MALARIĆ, M. LOJKIĆ, I. FOLNOŽIĆ, S. MILINKOVIĆ TUR, M. KRESZINGER, M. SAMARDŽIJA, **S. ČIPČIĆ**, N. ŽURA, M. OSTOVIĆ, M. VILIĆ (2024): The distribution of boars spermatozoa in morphometrically distinct subpopulations after *in vitro* exposure to radiofrequency electromagnetic radiation at 2500 MHz and their motility. *Animals* 14, 828. doi: 10.3390/ani14060828

Sudjelovanje na skupovima:

ŽURA ŽAJA, I., V. BERTA, H. VALPOTIĆ, M. SAMARDŽIJA, S. MILINKOVIĆ-TUR, M. VILIĆ, D. ĐURIČIĆ, B. ŠPOLJARIĆ, J. ŠURAN, **S. ČIPČIĆ**, S. VINCE (2019): The effect of exogenous melatonin on antioxidative enzymatic activity of French Alpine bucks seminal plasma and spermatozoa during the non-breeding season. *Proceeding of Middle-European Buiatric Congress*. 22-25 May Lavov, Ukraine, *Anim. Biol.* 21(2), pp. 150-150.

SENAŠI, K., I. BUTKOVIĆ, M. VILIĆ, S. VINCE, N. POLJIČAK MILAS, K. MALARIĆ, M. LOJKIĆ, I. FOLNOŽIĆ, S. MILINKOVIĆ TUR, V. BERTA, **S. ČIPČIĆ**, A. SLUGANOVIĆ, I. ŽURA ŽAJA (2021): Distribution of boars spermatozoa in morphometrically distinct subpopulations after *in vitro* exposure to radiofrequency radiation at 2500 MHz. *The 15th Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation Program and Abstract book online*, 7-8. October, "online", Croatia, pp. 59-59.

SHEK VUGROVEČKI, A., J. MILJKOVIĆ, S. VINCE, N. POLJIČAK MILAS, P. PRGOMET, L. RODMAN, D. HORVATEK TOMIĆ, M. VILIĆ, M. RADIN, **S. ČIPČIĆ**, A. SLUGANOVIĆ, I. ŽURA ŽAJA (2021): Do different types of semi-aquatic turtles have morphometrically different erythrocytes? *Proceedings of the 2nd International Scientific and Professional Meeting on Reptiles and Exotic Animals "Reptilia"*. 21.-22. May, Zagreb, Croatia, pp. 154-154.

BUTKOVIĆ, I., I. FOLNOŽIĆ, M. LOJKIĆ, S. VINCE, K. MALARIĆ, M. VILIĆ, S. MILINKOVIĆ TUR, V. BERTA, **S. ČIPČIĆ**, A. SLUGANOVIĆ, I. ŽURA ŽAJA (2022): Effect of *in vitro* exposure to 3500 MHz radiofrequency electromagnetic field on spermatozoa DNA integrity and vitality indicators in ejaculates of breeding boars. *Proceedings of 3rd Regional Congress of Physiological Societies and 5th Congress of*

Croatian Physiological Society. 22.- 24. September, NK Plitvička jezera, Croatia, pp. 104-104.

ČIPČIĆ, S., I. ŽURA ŽAJA, V. BERTA, M. LOJKIĆ, P. PRGOMET, L. RODMAN, S. MILINKOVIĆ TUR, B. ŠPOLJARIĆ, J. PEJAKOVIĆ HLEDE, S. VINCE (2023): Distribution of buck spermatozoa in morphometrically distinct subpopulations in regard to values of kinetic parameters. Book of Abstracts of 10th International Congress Veterinary Science and Profession. 5-7 October, Zagreb, Croatia, pp. 132-132.